

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2001年7月5日 (01.07.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/48188 A1

- (53) 国際特許分類: C12N 15/09, I13, I19, I21, S10, C07K 14/00, 16/28, C12P 21/02, C13Q 1/02, 1/03, A61K 31/71, 48/00, A61P 43/00, G01N 33/15, 33/50
- (51) 国際出願番号: PCT/JP0009408
- (52) 国際公開日: 2000年12月28日 (28.12.2000)
- (53) 国際出願の言語: 日本語
- (54) 国際公開の言語: 日本語
- (50) 優先権データ:
特開平11/075152
特開2000/101339 1999年12月28日 (28.12.1999) JP
2000年3月31日 (31.03.2000) JP
- (71) 出願人 (外国を除く全ての指定国について): 株式会社ヘリックス研究所 (HELIX RESEARCH INSTITUTE) (JP/JP), 〒292-0812 千葉県本更津市矢部 1332 番地 3 Chiba (JP)
- (72) 発明者; および
(73) 発明者/出願人 (外国についてのみ): 松本 豊一 郎 (MATSUMOTO, Shun-ichiro) (JP/JP), 〒273-0005 千葉県船橋市本町 4-43-2-605 Chiba (JP), 小田 理 (ODA, Tamasaki) (JP/JP), 〒292-0054 千葉県本更津市泉原 393-203 Chiba (JP), 斎藤 邦子 (SAITO, Yoko) (JP/JP), 〒292-0043 千葉県本更津市本太田 4-5-13-103 Chiba (JP), 森川 昭行 (MORIKAWA, Maruyoshi) (JP/JP), 〒292-0033 千葉県本更津市員部 3-9-17-408 Chiba (JP), 吉田 賢二 (YOSHIDA, Kenji) (JP/JP), 〒292-0043 千葉県本更津市本太田 4-1-1-302 Chiba (JP), 藤田 孝子 (FUJITA, Makiko) (JP/JP), 〒144-0052 東京都大田区田町 1-24-4 Tokyo (JP), 杉山 宜康 (SUGIYAMA, Tameyasu) (JP/JP), 〒292-0045 千葉県本更津市清見 2-6-23-102 Chiba (JP), 岸本 利光 (KISHIMOTO, Yoshinori) (JP/JP), 神崎 康治 (KANZAKI, Kousji) (JP/JP), 徳田 慎一郎 (TOKUDA, Shin-ichiro) (JP/JP), 井上 佳久 (INOUE, Yoshikazu) (JP/JP), 〒273-1153 大阪府枚方市南園大 2-25-1 ウェルファイド株式会社 創薬研究所内 Osaka (JP)
- (74) 代理人: 清水 初恵, 外 (SHIMIZU, Hatsue et al.); 〒300-0847 茨城県土浦市町町 1-1-1 国鉄つくばビル 6 階 Itadaki (JP)
- (51) 特許国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, SN, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

[発明者]

(54) Title: NOVEL GUANOSINE TRIPHOSPHATE-BINDING PROTEIN-COUPLED RECEPTORS, GENES THEREOF AND PRODUCTION AND USE OF THE SAME

(54) 発明の名称: 新規なグアノシン三リン酸結合蛋白質共役型の受容体およびそれらの遺伝子、並びにそれらの製造および用途

(57) Abstract: Nine novel genes sustaining hydrophobic domains, which are seemingly 7 transmembrane domains characteristic to G protein-coupled receptors, are successfully isolated by human tissue cDNA screening. These genes and proteins which are the expression products thereof are usable in screening ligands, screening agonists or antagonists which are useful as drugs, diagnosing diseases in which these genes participate, etc.

(57) 要約:

ヒト組織 cDNA のスクリーニングにより、G 蛋白質共役型受容体の特徴である 7 個の膜貫通ドメインと考えられる疎水性領域を保持する 9 種類の新規遺伝子を単離することに成功した。これら遺伝子やその翻訳産物である蛋白質は、リガンドのスクリーニングや医薬品として有用なアゴニストやアンタゴニストのスクリーニング、さらにはこれら遺伝子が関連する疾患の診断などに利用し得る。

WO 01/48188 A1

PCT/JP00/09408

-1-

明細書

新規なグアノシン三リン酸結合蛋白質共役型の受容体およびそれらの遺伝子、並びにそれらの製造および用途

技術分野

本発明は、新規な G 蛋白質共役型受容体およびそれらの遺伝子、並びにそれらの製造および用途に関する。

背景技術

G 蛋白質共役型受容体 (G protein-coupled receptors) は、三量体型 GTP 結合蛋白質の活性化を介して細胞内にシグナルを伝達する細胞膜受容体群の総称である。G 蛋白質共役型受容体は、分子内に細胞膜貫通領域を 7 回有する構造上の特性から、「7 回膜貫通型受容体」とも呼ばれる。G 蛋白質共役型受容体は様々な生理活性物質の情報を、三量体型 GTP 結合蛋白質の活性化、それにより引き起こされる細胞内セカンドメッセンジャーの発動を介して細胞膜から細胞内へと伝達する。三量体型 GTP 結合蛋白質により制御される細胞内セカンドメッセンジャーは、アデニレートシクラーゼを介する cAMP、フォスホリパーゼ C を介する Ca²⁺ などがよく知られているが、三量体型 GTP 結合蛋白質を介したチャネルの制御、リン酸化酵素の活性化など多くの細胞蛋白がその標的となっていることが最近明らかになってきた (Annu. Rev. Neurosci. (97) 20:399)。G 蛋白質共役型受容体に対する基質 (リガンド) は、大変多岐に渡っており、タンパク性ホルモン、ケモカイン、ペプチド、アミン、脂質由来物質、さらにはトロンビンの様なプロテアーゼもその一例となる。現在、遺伝子が同定された G 蛋白質共役型受容体の数は感覚器受容体を除くと、ヒトで 300 個弱存在するが、リガンドが同定された G 蛋白質共役型受容体の数は、そのうち約 140 種類に過ぎず、リガ

(54) 特許国 (広域): AR, JP, KR, US, AU, CA, CN, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, SN, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

特許分類:
— 国際特許報告書

2 文字コード及び他の略語については、発明者発行される各 PCT がセットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

WO 01/48188 A1

PCT/JP00/09408

-2-

ド未知な「オーファン G 蛋白質共役型受容体」が 100 種類以上存在している。しかしながら実際のヒトゲノム中には、少なくとも 400 種類、場合によっては 1000 種類もの G 蛋白質共役型受容体が存在する、とも想定されている (Trends Pharmacol. Sci. (97) 18:430)。この事は、今後のゲノム解析の飛躍的進展に伴って、機能未知なオーファン G 蛋白質共役型受容体の数も爆発的に増加する事を意味している。

これまでに世界の製薬企業により創られてきた薬剤は、その 9 割以上が細胞外空間での相互作用を標的としており、その中でも G 蛋白質共役型受容体に関連する低分子薬は大部分を占めている。その根拠としては、G 蛋白質共役型受容体が関連する疾患が、遺伝的疾患を始めとして、神経系、循環器系、消化器系、免疫系、運動器系、泌尿器生殖系など、非常に多くの領域に関連することにある。そのため、最近では多くの製薬企業がゲノム解析で明らかとなったオーファン G 蛋白質共役型受容体を所有し、リガンド探索と生理機能の解明に熱を削っている。こうした状況を背景として、最近では新規 G 蛋白質共役型受容体の生理的リガンド探索の成功例も報告され始めている。例えば、calcitonin gene-related peptide 受容体 (J. Biol. Chem. (96) 271:11325)、orexin (Cell (98) 9:2:573) そして prolactin-releasing peptide (Nature (98) 393:272) などの事例は、生命科学分野での基礎研究としても大きな衝撃を持つ事例であった。

特に、オーファン G 蛋白質共役型受容体は新たな薬剤開発に繋がる可能性の高い標的として、多大な注目を集めている。一般的にオーファン G 蛋白質共役型受容体には特異的なリガンドが存在しないため、そのアゴニスト、アンタゴニストを開発することは困難であった。しかし、近年、充実された化合物ライブラリーとハイスループットスクリーニングと組み合わせることで、オーファン G 蛋白質共役型受容体を標的とした薬剤の創製が提唱されている (Trends Pharmacol. Sci. (97) 18:430, Br. J. Pharm. (98) 125:1387)。すなわち、遺伝子操作によって同定されたオーファン G 蛋白質共役型受容体を、細胞内セカンドメッ

BEST AVAILABLE COPY

センジャーである cAMP, Ca^{2+} の変化を指標とした機能スクリーニングにより生理的アゴニストを発見し、生体内機能解析を行うというものである。この際、化合物ライブラリーを利用して、スクリーニングをハイスループット化することにより、オーファン G 蛋白質共役型受容体に対する特異的な代替 (surrogate) アゴニスト及びアンタゴニストの発見、ひいては特定の疾患治療薬の開発も理論的には可能となる。

発明の開示

本発明は、このような G 蛋白質共役型受容体を取り巻く現状に鑑みてなされたものであり、その目的は新規な G 蛋白質共役型受容体およびその遺伝子、並びにそれらの製造方法及び用途を提供することにある。さらにこれら分子を薬剤開発研究の標的として提供することを目的とする。

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、ヒト組織 cDNA を鋳型にしたポリメラーゼ連鎖反応を実施することにより、G 蛋白質共役型受容体の特徴である 7 個の膜貫通ドメインと考えられる疎水性領域を保持する 9 種類の新規遺伝子を単離することに成功した。これら遺伝子やその翻訳産物である蛋白質は、リガンドのスクリーニングや医薬品として有用なアゴニストやアンタゴニストのスクリーニング、あるいはこれら遺伝子が関連する疾患の診断に利用し得る。

即ち、本発明は、新規な G 蛋白質共役型受容体およびそれらの遺伝子、並びにそれらの製造および用途に関し、より具体的には、

(1) グアノシン三リン酸結合蛋白質共役型の受容体をコードする下記 (a) から (d) のいずれかに記載の DNA、

(a) 配列番号：1 から 4、17 から 21 のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる蛋白質をコードする DNA、

(b) 被検試料非存在下での結合活性と比較して、工程 (a) で検出された結合活性を低下させる化合物を選択する工程、を含む方法、

(9) (5) に記載の蛋白質の活性を阻害または促進する化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 被検試料の存在下で該蛋白質を発現する細胞に該蛋白質のリガンドを接触させる工程、

(b) 該リガンドの該蛋白質への結合による細胞における変化を検出する工程、

(c) 被検試料非存在下での細胞における変化と比較して、工程 (b) で検出された細胞における変化を抑制または増強させる化合物を選択する工程、を含む方法、

(10) 細胞における変化が、cAMP 濃度の変化またはカルシウム濃度の変化である、(8) または (9) に記載の方法、

(11) (5) に記載の蛋白質に結合する抗体、

(12) (7) から (10) のいずれかに記載のスクリーニングにより単離される化合物、および

(13) (12) に記載の化合物を有効成分とする医薬組成物、および

(14) 癌、肝硬変、およびアルツハイマー病からなる群より選択される疾患の治療のための、(13) に記載の医薬組成物、

(15) 配列番号：5 から 8、22 から 26 のいずれかに記載の塩基配列からなる DNA またはその相補鎖に相補的な、少なくとも 15 ヌクレオチドの鎖長を有するヌクレオチド、

(16) 癌、肝硬変、およびアルツハイマー病からなる群より選択される疾患の診断方法であって、被検者由来の該疾患に関連した組織における (1) に記載の DNA の発現、または被検者における (1) に記載の DNA の変異を検出することを含む方法、

(b) 配列番号：5 から 8、22 から 26 のいずれかに記載の塩基配列のコード領域を含む DNA、

(c) 配列番号：1 から 4、17 から 21 のいずれかに記載のアミノ酸配列において 1 もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および/または挿入したアミノ酸配列からなる蛋白質をコードする DNA、

(d) 配列番号：5 から 8、22 から 26 のいずれかに記載の塩基配列からなる DNA にストリンジントな条件下でハイブリダイズする DNA、

(2) 配列番号：1 から 4、17 から 21 のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる蛋白質の部分ペプチドをコードする DNA、

(3) (1) または (2) に記載の DNA を含有するベクター、

(4) (1) または (2) に記載の DNA または (3) に記載のベクターを保持する形質転換体、

(5) (1) または (2) に記載の DNA によりコードされる蛋白質またはペプチド、

(6) (4) に記載の形質転換体を培養し、該形質転換体またはその培養上清から発現させた蛋白質またはペプチドを回収する工程を含む、(5) に記載の蛋白質またはペプチドの製造方法、

(7) (5) に記載の蛋白質に結合するリガンドのスクリーニング方法であって、

(a) (5) に記載の蛋白質またはペプチドに被検試料を接触させる工程、

(b) 該蛋白質またはペプチドに結合する化合物を選択する工程、を含む方法、

(8) (5) に記載の蛋白質とそのリガンドとの結合を阻害する活性を有する化合物のスクリーニング方法であって、

(a) 被検試料の存在下で (5) に記載の蛋白質またはその部分ペプチドにリガンドを接触させ、該蛋白質またはその部分ペプチドとリガンドとの結合活性を検出する工程、

(17) (11) に記載の抗体または (15) に記載のヌクレオチドを含む、癌、肝硬変、およびアルツハイマー病からなる群より選択される疾患の診断薬、を提供するものである。

なお、本発明において「G 蛋白質共役型受容体」とは、GTP 結合蛋白質の活性化を介して細胞内にシグナルを伝達する細胞膜受容体を指す。

本発明において「リガンド」とは、G 蛋白質共役型受容体に結合し、細胞内にシグナルを伝達する生理的物質を指す。ここで「生理的物質」とは、生体内で G 蛋白質共役型受容体に結合している化合物を指す。

本発明において「アゴニスト」とは、G 蛋白質共役型受容体に結合し、細胞内にシグナルを伝達する化合物を指し、生理的物質、人工的に合成した化合物、天然由来の化合物を含む。

本発明において「アンタゴニスト」とは、リガンドが G 蛋白質共役型受容体に結合すること、もしくは細胞内にシグナルを伝達することを阻害する化合物を指し、生理的物質、人工的に合成した化合物、天然由来の化合物を含む。

本発明は、新規な G 蛋白質共役型受容体および該蛋白質をコードする DNA を提供する。本発明に含まれる、本発明者等により単離された 9 のヒト由来の cDNA クローンを、「GPRv8」、「GPRv12」、「GPRv16」、「GPRv21」、「GPRv40」、「GPRv47」、「GPRv51」、「GPRv71」、「GPRv72」と命名した (必要に応じてこれらクローンをまとめて「GPRv」と称する)。これら cDNA の塩基配列を配列番号：5 から 8、22 から 26 に、該 cDNA によりコードされる蛋白質のアミノ酸配列を配列番号：1 から 4、17 から 21 に示す。

BLAST 検索の結果、GPRv cDNA がコードする蛋白質は、いずれも既知の G 蛋白質共役型受容体と有意なアミノ酸配列上の相同性を示した。具体的には、「GPRv8」は HUMAN VASOPRESSIN V1B RECEPTOR (P47901, 424aa) に対して 36% の相同性を、「GPRv12」は RAT 5-HYDROXYTRYPTAMINE 6 RECEPTOR (P31388, 436aa) に対して 27% の相同性を、「GPRv16」は MOUSE GALANIN RECEPTOR TYPE 1 (P56479

、348aa)に対して28%の相同性を、「GPRv21」はBOVIN NEUROPEPTIDE Y RECEPTOR TYPE 2 (P79113, 384aa)に対して30%の相同性を、「GPRv40」はOXYTOCIN RECEPTOR (P97926, 388aa)に対して34%の相同性を、「GPRv47」はGPRX_ORVLA PROBABLE G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR (Q91178, 428aa)に対して43%の相同性を、「GPRv51」はPROBABLE G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR RTA (P23749, 343aa)に対して37%の相同性を、「GPRv71」はChicken P2Y PURINOCEPTOR 3 (P2Y3) (Q98907, 328aa)に対して45%の相同性を、「GPRv72」はALPHA-1A ADRENERGIC RECEPTOR (002824, 466aa)に対して30%の相同性をそれぞれ示した。

また、本発明者等が単離したGPRv cDNAがコードする蛋白質(以下、「GPRv蛋白質」と称することがある)は、いずれもG蛋白質共役型受容体の特徴である7個の膜貫通ドメインと考えられる疎水性領域を保持していた。これら事実から、GPRv cDNAは、いずれもG蛋白質共役型受容体ファミリーに属する蛋白質をコードしていると考えられる。G蛋白質共役型受容体は、そのリガンドの作用によりG蛋白質の活性化を通じて細胞内シグナル伝達を行なう活性を有しており、上記したように遺伝的疾患を始めとして、脳神経系、循環器系、消化器系、免疫系、運動器系、泌尿生殖器系などの非常に多くの領域の疾患に関連している。従って、GPRv蛋白質は、GPRv蛋白質の機能を調節するアゴニストやアンタゴニストなどのスクリーニングに利用することができ、上記疾患に対する医薬品の開発の重要な標的となる。

本発明は、また、GPRv蛋白質と機能的に同等な蛋白質を提供する。ここで「機能的に同等」とは、対象となる蛋白質がGPRv蛋白質と同等の生物学的特性を有していることを意味する。GPRv蛋白質が持つ生物学的特性としては、三量体型GTP結合蛋白質の活性化を介して細胞内シグナル伝達を行なう活性が挙げられる。三量体型GTP結合蛋白質は、活性化する細胞内伝達系の種類によって、Ca²⁺を上昇させるGq型、cAMPを上昇させるGs型、そしてcAMPを抑制するGi型の3種類のカテゴリーに分類される(*Trends Pharmacol.Sci.* (99) 20:118)。

蛋白質であって、GPRv蛋白質と機能的に同等な蛋白質もまた本発明の蛋白質に含まれる。

このような蛋白質を単離するための生物としては、ヒト以外に、例えば、ラット、マウス、ウサギ、ニワトリ、ブタ、ウシ等が挙げられるが、これらに制限されない。

GPRv蛋白質と機能的に同等な蛋白質をコードするDNAを単離するためのストリンジェントなハイブリダイゼーション条件としては、通常「1xSSC、0.1% SDS、37°C」程度の条件であり、より厳しい条件としては「0.5xSSC、0.1% SDS、42°C」程度の条件であり、さらに厳しい条件としては「0.2xSSC、0.1% SDS、65°C」程度の条件である。このようにハイブリダイゼーションの条件が厳しくなるほどプローブ配列と高い相同性を有するDNAの単離を期待しうる。但し、上記SSC、SDSおよび温度の条件の組み合わせは例示であり、当業者であれば、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーを決定する上記若しくは他の要素(例えば、プローブ濃度、プローブの長さ、ハイブリダイゼーション反応時間など)を適宜組み合わせることにより、上記と同様のストリンジェンシーを実現することが可能である。

このようなハイブリダイゼーション技術を利用して単離されるDNAがコードする蛋白質は、通常、GPRv蛋白質とアミノ酸配列において高い相同性を有する。高い相同性とは、少なくとも40%以上、好ましくは60%以上、さらに好ましくは80%以上(例えば、90%以上や95%以上)の配列の相同性を指す。

アミノ酸配列や塩基配列の同一性は、Karlin and AltschulによるアルゴリズムBLAST(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877, 1993)によって決定することができる。このアルゴリズムに基づいて、BLASTNやBLASTXと呼ばれるプログラムが開発されている(Altschul et al. J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990)。BLASTに基づいてBLASTNによって塩基配列を解析する場合には、パラメータはたとえばscore = 100、wordlength = 12とする。また、BLASTに基づいて

従って、対象となる蛋白質がGPRv蛋白質と同等の生物学的特性を有しているか否かは、例えば、その活性化による細胞内のcAMP濃度もしくはカルシウム濃度の変化を検出することにより評価することが可能である。

GPRv蛋白質と機能的に同等な蛋白質を開発するための方法の1つの態様としては、蛋白質中のアミノ酸配列に変異を導入する方法が挙げられる。このような方法には、例えば、部位特異的変異誘発法(*Current Protocols in Molecular Biology* edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons Section 8.1-8.5))が含まれる。また、蛋白質中のアミノ酸の変異は、自然界において生じることもある。本発明には、このように人工的か自然に生じたものかを問わず、GPRv蛋白質のアミノ酸配列(配列番号: 1から4、17から21)において1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入および/もしくは付加などにより変異した蛋白質であって、GPRv蛋白質と機能的に同等な蛋白質が含まれる。これら蛋白質におけるアミノ酸の変異数や変異部位は、GPRv蛋白質の機能が保持される限り制限はない。変異数は、典型的には、全アミノ酸の10%以内であり、好ましくは全アミノ酸の5%以内であり、さらに好ましくは全アミノ酸の1%以内であると考えられる。

GPRv蛋白質と機能的に同等な蛋白質を開発するための方法の他の態様としては、ハイブリダイゼーション技術あるいは遺伝子増幅技術を利用する方法が挙げられる。即ち、当業者であれば、ハイブリダイゼーション技術(*Current Protocols in Molecular Biology* edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons Section 6.3-6.4))を利用してGPRv蛋白質をコードするDNA配列(配列番号: 5から8、22から26)またはその一部をもとに同種または異種生物由来のDNA試料から、これと相同性の高いDNAを単離して、該DNAからGPRv蛋白質と機能的に同等な蛋白質を得ることは、通常行いうることである。このようにGPRv蛋白質をコードするDNAとハイブリダイズするDNAによりコードされる

BLASTXによってアミノ酸配列を解析する場合には、パラメータはたとえばscore = 50、wordlength = 3とする。BLASTとGapped BLASTプログラムを用いる場合には、各プログラムのデフォルトパラメータを用いる。これらの解析方法の具体的な手法は公知である(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)。

また、遺伝子増幅技術(PCR) (*Current protocols in Molecular Biology* edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons Section 6.1-6.4))を用いてGPRv蛋白質をコードするDNA配列(配列番号: 5から8、22から26)の一部を基にプライマーを設計し、GPRv蛋白質をコードするDNA配列と相同性の高いDNA断片を単離し、該DNAを基にGPRv蛋白質と機能的に同等な蛋白質を得ることも可能である。

本発明は、また、本発明の蛋白質の部分ペプチドを含む。この部分ペプチドには、リガンドに結合するシグナル伝達を行なわないペプチドが含まれる。このようなペプチドを基に作製したアフィニティカラムは、リガンドのスクリーニングに好適に用いることができる。また、本発明の蛋白質の部分ペプチドは、抗体作製に用いることも可能である。本発明の部分ペプチドは、例えば、遺伝子工学的手法、公知のペプチド合成法、あるいは本発明の蛋白質を適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。本発明の部分ペプチドは、通常、8アミノ酸残基以上、好ましくは12アミノ酸残基以上(例えば、15アミノ酸残基以上)である。

本発明の蛋白質は、組換え蛋白質として、また天然の蛋白質として調製することが可能である。組換え蛋白質は、例えば、後述するように本発明の蛋白質をコードするDNAを挿入したベクターを適当な宿主細胞に導入し、形質転換体内で発現した蛋白質を精製することにより調製することが可能である。一方、天然の蛋白質は、例えば、後述する本発明の蛋白質に対する抗体を結合したアフィニティカラムを利用して調製することができる(*Current Protocols in Molecular Biology* edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons Section

n 16.1-16.19)。アフィニティー精製に用いる抗体は、ポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であってもよい。また、インビトロトランスレーション（例えば、「On the fidelity of mRNA translation in the nuclease-treated rabbit reticulocyte lysate system. Dasso, M.C., Jackson, B.J. (1989) *MA* 17:3129-3144」参照）などにより本発明の蛋白質を調製することも可能である。

また、本発明は、上記本発明の蛋白質をコードする DNA を提供する。本発明の DNA としては、本発明の蛋白質をコードするものであれば、その形態に特に制限はなく、cDNA の他、ゲノム DNA、化学合成 DNA など含まれる。また、本発明の蛋白質をコードする限り、遺伝符号の縮重に基づく任意の塩基配列を有する DNA が含まれる。本発明の DNA は、上記のように、GPEV 蛋白質をコードする DNA 配列（配列番号：5 から 8、22 から 26）あるいはその一部をプローブとしたハイブリダイゼーション法やこれら DNA 配列をもとに合成したプライマーを用いた PCR 法等の常法により単離することが可能である。

また、本発明は、本発明の DNA が挿入されたベクターを提供する。本発明のベクターとしては、挿入した DNA を安定に保持するものであれば特に制限されず、例えば宿主に大腸菌を用いるのであれば、クローニング用ベクターとしては pBluescript ベクター（Stratagene 社製）などが好ましい。本発明の蛋白質を生産する目的においてベクターを用いる場合には、特に発現ベクターが有用である。発現ベクターとしては、試験管内、大腸菌内、培養細胞内、生物個体内で蛋白質を発現するベクターであれば特に制限されないが、例えば、試験管内発現であれば pBEST ベクター（プロメガ社製）、大腸菌内であれば pET ベクター（Invitrogen 社製）、培養細胞内であれば pHE18S-FL3 ベクター（GenBank Accession No. AB009864）、生物個体内であれば pME18S ベクター（*Mol Cell Biol.* 8:466-472(1988)）などが好ましい。ベクターへの本発明の DNA の挿入は、常法により、例えば、制限酵素サイトを用いたリガーゼ反応により行うことができる（*Current*

DNA に特異的にハイブリダイズするものである。「特異的にハイブリダイズする」とは、通常のハイブリダイゼーション条件下、好ましくはストリンジエントな条件下で、本発明の蛋白質をコードする DNA（配列番号：5 から 8、22 から 26）とハイブリダイズし、他の蛋白質をコードする DNA とはハイブリダイズしないことを意味する。

これらヌクレオチドは、本発明の蛋白質の異常を検査・診断するために利用できる。例えば、これらヌクレオチドをプローブやプライマーとして用いたノーザンハイブリダイゼーションや RT-PCR により、本発明の蛋白質をコードする DNA の発現異常を検査することができる。これらヌクレオチドは、例えば、癌、肝硬変、またはアルツハイマー病の検査への利用が考えられる。また、これらヌクレオチドをプライマーとして用いたポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により本発明の蛋白質をコードする DNA やその発現制御領域を増幅し、RFLP 解析、SSCP、シーケンシング等の方法により、DNA 配列の異常を検査・診断することができる。

また、これらヌクレオチドには、本発明の蛋白質の発現を抑制するためのアンチセンス DNA が含まれる。アンチセンス DNA は、アンチセンス効果を引き起こすために、少なくとも 15bp 以上、好ましくは 100bp、さらに好ましくは 500bp 以上の鎖長を有し、通常、3000bp 以内、好ましくは 2000bp 以内の鎖長を有する。このようなアンチセンス DNA には、本発明の蛋白質の異常（機能異常や発現異常）などに起因した疾患の遺伝子治療への応用も考えられる。該アンチセンス DNA は、例えば、本発明の蛋白質をコードする DNA（例えば、配列番号：5 から 8、22 から 26）の配列情報に基づきホスホロチオネート法（Stein, 1988 *Phy sicochemical properties of phosphorothioate oligodeoxynucleotides. Nuc leic Acids Res* 16, 3209-21 (1988)）などにより調製することが可能である。

本発明のヌクレオチドは、遺伝子治療に用いる場合には、例えば、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクターなどのウ

protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 11.4-11.11)。

また、本発明は、本発明の DNA または本発明のベクターを保持する形質転換体を提供する。本発明のベクターが導入される宿主細胞としては特に制限はなく、目的に応じて種々の宿主細胞が用いられる。蛋白質を高発現させるための真核細胞としては、例えば、COS 細胞、CHO 細胞などを例示することができる。宿主細胞へのベクター導入は、例えば、リン酸カルシウム沈降法、電気パルス穿孔法（*Current protocols in Molecular Biology* edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 9.1-9.9）、リポフェクタミン法（GIBCO-BRL 社製）、マイクロインジェクション法などの公知の方法で行うことができる。

また、本発明は、本発明の蛋白質をコードする DNA（配列番号：5 から 8、22 から 26）のいずれかに記載の塩基配列からなる DNA またはその相補鎖）に相補的な、少なくとも 15 ヌクレオチドの鎖長を有するヌクレオチドを提供する。ここで「相補鎖」とは、A:T（ただし RNA の場合は U）、G:C の塩基対からなる 2 本鎖核酸の一方の鎖に対する他方の鎖を指す。また、「相補的」とは、少なくとも 15 個の連続したヌクレオチド領域で完全に相補配列である場合に限りならず、少なくとも 70%、好ましくは少なくとも 80%、より好ましくは 90%、さらに好ましくは 95% 以上の塩基配列上の相同性を有すればよい。相同性を決定するためのアルゴリズムは本明細書に記載したものを使用すればよい。このようなヌクレオチドは、本発明の DNA を検出、単離するためのプローブとして、また、本発明の DNA を増幅するためのプライマーとして利用することが可能である。プライマーとして用いる場合には、通常、15bp~100bp、好ましくは 15bp~35bp の鎖長を有する。また、プローブとして用いる場合には、本発明の DNA の少なくとも一部若しくは全部の配列を含む少なくとも 15bp の鎖長のヌクレオチドが用いられる。このようなヌクレオチドは、好ましくは本発明の蛋白質をコードする

イルスベクターやリボソームなどの非ウイルスベクターなどを利用して、*ex vivo* 法や *in vivo* 法などにより患者へ投与を行うことが考えられる。

また、本発明は、本発明の蛋白質に結合する抗体を提供する。本発明の抗体の形態には特に制限はなく、ポリクローナル抗体やモノクローナル抗体または抗原結合性を有するそれらの一部が含まれる。また、全てのクラスの抗体が含まれる。さらに、本発明の抗体には、ヒト抗体などの特殊抗体も含まれる。

本発明の抗体は、ポリクローナル抗体の場合には、常法に従い本発明の蛋白質のアミノ酸配列に相当するオリゴペプチドを合成し、家兎に免疫することにより得ることが可能である（*Current protocols in Molecular Biology* edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 11.12-11.13）。モノクローナル抗体の場合には、常法に従い大腸菌で発現し精製した蛋白質を用いてマウスを免疫し、その脾臓細胞と骨髓腫細胞を細胞融合させたハイブリドーマ細胞を開製し、該ハイブリドーマ細胞から得ることができる（*Current protocols in Molecular Biology* edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 11.4-11.11)。

本発明の蛋白質に結合する抗体は、本発明の蛋白質の精製に加え、例えば、本発明の蛋白質の発現異常や構造異常の検査・診断に利用することも考えられる。具体的には、例えば組織、血液、または細胞などから蛋白質を抽出し、ウェスタンブロッティング、免疫沈降、ELISA 等の方法による本発明の蛋白質の検出を通じて、発現や構造の異常の有無を検査・診断することができる。本発明の抗体は、例えば、癌、肝硬変、またはアルツハイマー病の検査への利用が考えられる。

また、本発明の蛋白質に結合する抗体を、本発明の蛋白質に関連した疾患の治療などの目的に利用することも考えられる。本発明の抗体は、本発明の蛋白質のアゴニストやアンタゴニストとして作用し得る。抗体を患者の治療目的で用いる場合には、ヒト抗体またはヒト化抗体が免疫原性の少ない点で好ましい。ヒト抗体は、免疫系をヒトのものに入れ換えたマウス（例えば、「Functional transp

plant of megabase human immunoglobulin loci recapitulates human antibody response in mice, Mendes, M.J. et al. (1997) *Nat. Genet.* 15:146-156 (参照) に免疫することにより調製することができる。また、ヒト抗体は、モノクローナル抗体の超可変領域を用いた遺伝子組換えによって調製することができる (*Methods in Enzymology* 203, 99-121 (1991))。

また、本発明は、本発明の蛋白質を利用した、本発明の蛋白質に結合するリガンドのスクリーニング方法を提供する。このスクリーニング方法は、(a) 本発明の蛋白質またはその部分ペプチドに被検試料を接触させる工程、(b) 該蛋白質またはその部分ペプチドに結合する化合物を選択する工程を含む。

被検試料としては、特に制限はなく、例えば、種々の G 蛋白質共役型受容体のリガンド活性については不明の公知化合物やペプチド (例えば、ケミカルファイルに登録されているもの) あるいはファージ・ディスプレイ法 (*J. Mol. Biol.* (1991) 222, 301-310) などを用いて作成されたランダム・ペプチド群を用いることができる。また、微生物の培養上清や、植物、海洋生物由来の天然成分などもスクリーニングの対象となる。その他、脳をはじめとする生体組織抽出物、細胞抽出液、遺伝子ライブラリーの発現産物などが挙げられるが、これらに制限されない。

スクリーニングに用いる本発明の蛋白質は、例えば、細胞表面に発現した形態、該細胞の細胞膜成分としての形態、アフィニティークラムに結合した形態であってもよい。

具体的なスクリーニングの手法としては、例えば、本発明の蛋白質のアフィニティークラムに被検試料を接触させ本発明の蛋白質に結合する化合物を精製する方法、ウエストウエスタンブロッティング法など多くの公知の方法を利用することができる。これら方法を利用する場合には、被検試料は適宜希釈し、この標識を利用して本発明の蛋白質との結合を検出することができる。また、これら方法の他に、本発明の蛋白質を発現する細胞膜を調製して、これをチップ上に固定し

上昇に帰結させ、CRE (cAMP-responsive element) を上流に有するレポーター遺伝子系での発現を指標とすることも可能である (*Trends Pharmacol. Sci.* (99) 20:118)。

このスクリーニング系において本発明の蛋白質を発現させる宿主細胞としては特に制限はなく、目的に応じて種々の宿主細胞が用いられるが、例えば、COS 細胞、CHO 細胞、HEK293 細胞などを例示することができる。本発明の蛋白質を脊椎動物細胞で発現させるためのベクターとしては、本発明の蛋白質をコードする遺伝子の upstream に位置するプロモーター、RNA のスプライス部位、ポリアデニル化部位および転写終結配列や複製起点等を有するものを好適に用いることができる。例えば、SV40 の初期プロモーターを有する pSV2dhfr (*Mol. Cell. Biol.* (1981) 1, 854-864) や、pEF-BOS (*Nucleic Acids Res.* (1990) 18, 5322)、pCDH8 (*Nature* (1987) 329, 840-842)、pCEP4 (Invitrogen 社) などは、G 蛋白質共役型受容体を発現させるのに有用なベクターである。ベクターへの本発明の DNA の挿入は常法により制限酵素サイトを用いたリガーゼ反応により行うことができる (*Current protocols in Molecular Biology* edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 11.4-11.11)。また、宿主細胞へのベクター導入は、例えば、リン酸カルシウム沈降法、電気パルス穿孔法 (*Current protocols in Molecular Biology* edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 9.1-9.9)、リポフェクタミン法 (GIBCO-BRL 社製)、Fu GENE6 試薬 (ペーリンガーマンハイム社)、マイクロインジェクション法などの公知の方法で行うことが可能である。

上記の本発明の蛋白質に結合するリガンドのスクリーニング方法により、リガンドが単離されれば、本発明の蛋白質とリガンドの相互作用を阻害する化合物のスクリーニングが可能となる。従って、本発明は、また、本発明の蛋白質とそのリガンドとの結合を阻害する活性を有する化合物のスクリーニング方法を提供する。このスクリーニング方法は、(a) 被検試料の存在下で本発明の蛋白質また

、リガンド結合時に三量体型 GTP 結合蛋白質が解離する事を、表面プラズモン共鳴 (surface plasmon resonance) の変化で検出する方法 (*Nature Biotechnology* (99) 17:1105) を用いることも可能である。

また、被検試料と本発明の蛋白質との結合活性は、被検試料が細胞表面に発現させた本発明の蛋白質へ結合することにより生じる細胞における変化を指標に検出することもできる。このような変化としては、例えば、細胞内の Ca^{2+} レベルの変化や cAMP レベルの変化が挙げられるが、これらに制限されない。具体的には、G 蛋白質共役型受容体に対するアゴニスト活性は GTPγS 結合法により測定できる。

この方法の 1 つの実施例として、G 蛋白質共役型受容体を発現させた細胞膜を 20mM HEPES (pH7.4), 100mM NaCl, 10mM MgCl₂, 50μM GDP 溶液中で、³⁵S で標識された GTPγS 400pM と混合させ、被検試料存在下と非存在下でインキュベーション後、濾過 (filtration) を行い、結合した GTPγS の放射活性を比較する手法を用いることができる。

また G 蛋白質共役型受容体は、三量体型 GTP 結合蛋白質の活性化を介して細胞内にシグナルを伝達するシステムを共有している。三量体型 GTP 結合蛋白質は、活性化する細胞内伝達系の種類によって、 Ca^{2+} を上昇させる Gq 型、cAMP を上昇させる Gs 型、そして cAMP を抑制する Gi 型の 3 種類に分類される。このことを応用して Gq 蛋白 α サブユニットと他の G 蛋白 α サブユニットとをキメラ化し、あるいは promiscuous な Gα 蛋白、Gα15、Gα16 を用いてリガンドスクリーニングの際の陽性シグナルを Gq の細胞内伝達経路である、 Ca^{2+} 上昇に帰結させることが可能である。上昇した Ca^{2+} レベルは、TRE (TPA responsive element) または MRE (multiple responsive element) を上流に有するレポーター遺伝子系、Fura-2、Fluo-3 などの染色指示薬そして蛍光蛋白 aequorin などの変化を指標として検出ができる。同様に、Gs 蛋白 α サブユニットと他の G 蛋白 α サブユニットとをキメラ化し、陽性シグナルを Gs の細胞内伝達経路である、cAMP

はその部分ペプチドにリガンドを接触させ、該蛋白質またはその部分ペプチドとリガンドとの結合活性を検出する工程、(b) 被検試料非存在下での結合活性と比較して、工程 (a) で検出された結合活性を低下させる化合物を選択する工程を含む。

被検試料としては、特に制限はなく、例えば、コンビナトリアル・ケミストリー技術 (Tetrahedron (1995) 51, 8135-8137) によって得られた化合物群、あるいはファージ・ディスプレイ法 (*J. Mol. Biol.* (1991) 222, 301-310) などを用いて作成されたランダム・ペプチド群を用いることができる。また、微生物の培養上清や、植物、海洋生物由来の天然成分などもスクリーニングの対象となる。その他、脳をはじめとする生体組織抽出物、細胞抽出液、遺伝子ライブラリーの発現産物、合成低分子化合物、合成ペプチド、天然化合物などが挙げられるが、これらに制限されない。

スクリーニングに用いる本発明の蛋白質は、例えば、細胞表面に発現した形態、該細胞の細胞膜成分としての形態、あるいはアフィニティークラムに結合した形態であってもよい。

具体的なスクリーニングの手法としては、例えば、リガンドを放射性同位元素などで標識して、被検試料の存在下において本発明の蛋白質と接触させ、被検試料非存在下で検出した場合と比較して、本発明の蛋白質とリガンドとの結合活性を低下させる化合物を、該リガンドに付された標識を基に検出する方法を用いることができる。また、上記の本発明の蛋白質に結合するリガンドのスクリーニングの場合と同様に、細胞内の変化を指標にスクリーニングすることも可能である。即ち、本発明の蛋白質を発現する細胞に被検試料の存在下でリガンドを接触させ、被検試料非存在下で検出した場合と比較して、該細胞における変化を減少させる化合物を選択することにより、本発明の蛋白質とリガンドとの結合を阻害する化合物をスクリーニングすることが可能である。本発明の蛋白質を発現する細胞は、上記した本発明の蛋白質に結合するリガンドのスクリーニングの場合と同

様に調製することができる。このスクリーニングにより単離される化合物は、本発明の蛋白質のアゴニストやアンタゴニストの候補となる。

また、本発明は、本発明の蛋白質の活性を阻害または促進する化合物をスクリーニングする方法を提供する。このスクリーニング方法は、(a) 被検試料の存在下で本発明の蛋白質を発現する細胞に該蛋白質のリガンドを接触させる工程、(b) 該リガンドの本発明の蛋白質への結合による細胞における変化を検出する工程、(c) 被検試料非存在下での細胞における変化と比較して、工程(b)で検出された細胞における変化を抑制または増強させる化合物を選択する工程、を含む。

被検試料としては、上記の本発明の蛋白質とリガンドとの結合を阻害する化合物のスクリーニング方法と同様に、コンビナトリアル・ケミストリー技術によって得られた化合物群、ファージ・ディスプレイ法などを応用して作成されたランダム・ペプチド群、微生物の培養上清や、植物、海洋生物由来の天然成分、生体組織抽出物、細胞抽出液、遺伝子ライブラリーの発現産物、合成低分子化合物、合成ペプチド、天然化合物などを用いることができる。また、上記の本発明の蛋白質とリガンドとの結合を阻害する化合物のスクリーニングにより単離された化合物を被検試料として用いることも可能である。本発明の蛋白質を発現する細胞は、上記した本発明の蛋白質に結合するリガンドのスクリーニングの場合と同様に調製することができる。被検試料接触後の細胞における変化は、上記のスクリーニング方法と同様に、細胞内の Ca^{2+} レベルや cAMP レベルの変化を指標に検出することができる。また、細胞内のシグナル伝達を検出する場合には、ルシフェラーゼなどをレポーター遺伝子とするレポーターアッセイ系等の測定系を利用して検出することも可能である。

この検出の結果、被検試料非存在下においてリガンドを接触させた場合の細胞における変化と比較して、被検試料を接触させた場合における細胞における変化が抑制されていれば、用いた被検試料は、本発明の蛋白質の活性を阻害する化合物

本発明は、また、本発明の GPRv 蛋白質をコードする遺伝子の発現を検出することの特徴とする。癌、肝硬変、またはアルツハイマー病の診断方法を提供する。

本実施例において、本発明の GPRv 蛋白質をコードする遺伝子が、癌、肝硬変、またはアルツハイマー病に関連した患部組織において、正常組織と比較して有意に発現レベルが相違することが見出された。従って、被検者のこれら組織における、本発明の GPRv 蛋白質をコードする遺伝子の発現を検出することにより、これら疾患の診断を行うことが可能である。ここで「遺伝子の発現」には、転写および翻訳の双方が含まれる。

本発明の診断方法は、例えば、以下の如く実施することができる。

生検により採取した組織に一部や血液サンプルなどから、常法により RNA を抽出し、実施例で示した定量的 PCR、ノーザンハイブリダイゼーション、あるいはドットプロットハイブリダイゼーションなどにより GPRv mRNA の定値を行い、診断することが可能である。また、上記組織から蛋白質を抽出し、ウェスタンブロッティング、免疫沈降、ELISA 等の方法を用いた GPRv 蛋白質の定値、あるいは、非侵襲的な方法として、GPRv 蛋白質に結合する化合物や抗体を標識したものを被検患者に投与し、PET (ポジトロンエミッショントモグラフィ) などの検出により診断することも可能である。

この診断の結果、被検者由来の組織における遺伝子の発現が、上記疾患に罹患した患者由来の組織における遺伝子の発現と、同一の傾向 (例えば、正常組織と比較した遺伝子の発現レベルの上昇または低下) を示せば、該被検者は、疾患に罹患している、または罹患のおそれがあると判定される。

例えば、GPRv8 は結腸で発現が認められるが、結腸癌での発現は顕著に上昇する。従って、被検者の結腸組織において、高レベルの GPRv8 の発現が認められた場合、この被検者は、結腸癌の疑いがある。また、正常の膵臓および子宮で発現が検出できなかったが、癌化で中程度発現した。従って、被検者の膵臓または

物であると判定される。逆に、被検試料が該細胞における変化を増強させれば、該化合物は、本発明の蛋白質の活性を促進する化合物であると判定される。なお、ここでいう「本発明の蛋白質の活性の促進または阻害する」とは、本発明の蛋白質に対する直接的な作用であると、間接的な作用であると問わず、結果として本発明の蛋白質の活性が促進または阻害されることを指す。従って、このスクリーニングにより単離される化合物には、本発明の蛋白質またはリガンドに作用してこれらの結合を阻害または促進することにより本発明の蛋白質の活性を阻害または促進する化合物の他、これらの結合自体を阻害または促進しないが、結果として本発明の蛋白質の活性を阻害または促進する化合物も含まれる。このような化合物には、例えば、本発明の蛋白質とリガンドとの結合を阻害しないが、細胞内のシグナル伝達経路を阻害若しくは促進する化合物が含まれる。

本発明のスクリーニング方法により単離される化合物を医薬品として用いる場合には、単離された化合物自体を直接患者に投与する以外に、公知の製剤学的方法により製剤化した医薬組成物として投与を行うことも可能である。例えば、薬理学上許容しうる担体 (賦形剤、結合剤、崩壊剤、増進剤、増進剤、乳化剤、希釈剤、溶解補助剤等) と混合して得られる医薬組成物または錠剤、丸剤、散剤、顆粒剤、カプセル剤、トローチ剤、シロップ剤、液剤、乳剤、懸濁剤、注射剤 (液剤、懸濁剤等)、坐剤、吸入剤、経皮吸収剤、点眼剤、眼軟膏等の製剤として経口または非経口に適した形態で処方される。患者への投与は、一般的には、例えば、動脈内注射、静脈内注射、皮下注射など当業者に公知の方法により行われる。投与量は、患者の体重や年齢、投与方法などにより変動するが、当業者であれば適当な投与量を適宜選択することが可能である。また、該化合物が DNA によりコードされるものであれば、該 DNA を遺伝子治療用ベクターに組み込み、遺伝子治療を行うことも考えられる。本発明のスクリーニング方法により単離される化合物は、例えば、癌、肝硬変、またはアルツハイマー病の治療への応用が期待される。

は子宮において、GPRv8 の発現が認められた場合、この被検者は膵臓癌または子宮癌の疑いがある。

GPRv12 は正常卵巣および精巣では発現が検出できなかったが、癌化で発現が検出できた。また、アルツハイマー病では海馬での発現が減少した。従って、被検者の卵巣または精巣において、GPRv12 の発現が認められた場合、この被検者は、卵巣癌または精巣癌の疑いがある。同様に、被検者の海馬において、正常値より低レベルの GPRv12 の発現が認められた場合、この被検者は、アルツハイマー病の疑いがある。

GPRv16 は、結腸で発現しているが、癌化で発現が検出できなくなった。脳では癌化で発現が増加した。肝臓では肝硬変により発現が検出できなくなった。アルツハイマー病の脳では海馬で発現が増強した。従って、被検者の結腸において正常値より低レベルの GPRv16 の発現が認められた場合、この被検者は結腸癌の疑いがある。また、脳において、正常値より高レベルの GPRv16 の発現が認められた場合、この被検者は脳の癌の疑いがある。また、肝臓において正常値より低レベルの GPRv16 の発現が認められた場合、この被検者は肝硬変の疑いがある。また、海馬において正常値より高レベルの GPRv16 の発現が認められた場合、この被検者はアルツハイマー病の疑いがある。

GPRv21 は、癌化により結腸及び精巣での発現が検出できなくなった。従って、被検者の結腸または精巣において正常値より低レベルの GPRv21 の発現が認められた場合、この被検者は結腸癌または精巣癌の疑いがある。

GPRv40 は、癌化により脳、精巣での発現が増加し、肝硬変により発現が減少した。従って、脳や精巣において正常値より高レベルの GPRv40 の発現が認められた場合、この被検者は脳の癌や精巣癌の疑いがある。また、肝臓において正常値より低レベルの GPRv40 の発現が認められた場合、この被検者は肝硬変の疑いがある。

GPRv47 は、癌化により脳、腎臓での発現が増加し、精巣での発現が減少した。肝臓での発現が肝硬変で検出できなくなった。従って、脳や腎臓において正常値より高レベルの GPRv47 の発現が認められた場合、この被検者は脳の癌または腎臓癌の疑いがある。また、肝臓において正常値より低レベルの GPRv47 の発現が認められた場合、この被検者は肝硬変の疑いがある。

GPRv51 は、結腸や精巣において癌化により発現が減少した。肝硬変の肝臓でも正常と比較して発現が減少した。アルツハイマー病において海馬で発現が増大した。従って、結腸や精巣において正常値より低レベルの GPRv51 の発現が認められた場合、この被検者は結腸癌または精巣癌の疑いがある。また、肝臓において正常値より低レベルの GPRv51 の発現が認められた場合、この被検者は肝硬変の疑いがある。また、海馬において正常値より高レベルの GPRv51 の発現が認められた場合、この被検者はアルツハイマー病の疑いがある。

GPRv71 は、癌化により結腸および腎臓での発現が減少し、肝硬変の肝臓では発現が検出できなくなった。アルツハイマー病では前頭葉での発現が減少した。従って、結腸または腎臓において正常値より低レベルの GPRv71 の発現が認められた場合、この被検者は結腸癌または腎臓癌の疑いがある。また、肝臓において正常値より低レベルの GPRv71 の発現が認められた場合、この被検者は肝硬変の疑いがある。また、前頭葉において正常値より低レベルの GPRv71 の発現が認められた場合、この被検者はアルツハイマー病の疑いがある。

GPRv72 は、結腸では強く発現しているが癌化で発現が検出できなくなった。アルツハイマー病の海馬で発現が増大した。従って、結腸において正常値より低レベルの GPRv72 の発現が認められた場合、この被検者は結腸癌の疑いがある。また、海馬において正常値より高レベルの GPRv72 の発現が認められた場合、この被検者はアルツハイマー病の疑いがある。

また、本発明の GPRv 蛋白質をコードする遺伝子の変異により、上記疾患が発症することと考えられる。従って、本発明の GPRv 蛋白質をコードする遺伝子の

変異を検出することにより、上記疾患の診断を行なうことも可能であると考えられる。

このような遺伝子診断は、例えば、以下の如く実施することができる。

診断用の核酸はゲノム DNA または cDNA を直接あるいは PCR もしくはその他の増幅法を用いて増幅してもよい。正常遺伝子との比較において、増幅生成物のサイズ変化により欠失および挿入を検出することができる。増幅 DNA と GPRv をコードする DNA をハイブリダイズさせ融解温度の差などにより点突然変異を同定することができる。DNA 配列の相違は、変性物質含有または不含のゲル中の DNA フラグメントの電気泳動の移動度の変化を検出することや、直接的な DNA 塩基配列決定により検出できる。

この診断の結果、被検者における GPRv 蛋白質をコードする遺伝子が正常型と比較して変異していた場合、該被検者は上記疾患の疑いがあると判定される。

即ち、本明細書記載の方法により GPRv 蛋白質をコードする遺伝子の変異、mRNA や蛋白質の発現の増加や減少を検出することにより、癌、肝硬変、またはアルツハイマー病の診断方法またはかかる疾患に対する感受性の診断方法が提供される。

図面の簡単な説明

図 1 は、「GPRv8」アミノ酸配列を「Query」にして、SWISS-PROT 全配列に対する BLAST 検索を行った結果を示す図である。HUMAN VASOPRESSIN V1B RECEPTOR に対し 36% の相同性を示した。

図 2 は、「GPRv12」アミノ酸配列を「Query」にして、SWISS-PROT 全配列に対する BLAST 検索を行った結果を示す図である。RAT 5-HYDROXYTRYPTAMINE 6 RECEPTOR に対し 27% の相同性を示した。

図 3 は、「GPRv16」アミノ酸配列を「Query」にして、SWISS-PROT 全配列に対する BLAST 検索を行った結果を示す図である。MOUSE GALANIN RECEPTOR TYPE 1 に対し 28% の相同性を示した。

図 4 は、「GPRv21」アミノ酸配列を「Query」にして、SWISS-PROT 全配列に対する BLAST 検索を行った結果を示す図である。BOVIN NEUROPEPTIDE Y RECEPTOR TYPE 2 に対して 30% の相同性を示した。

図 5 は、「GPRv40」アミノ酸配列を「Query」にして、SWISS-PROT 全配列に対する BLAST 検索を行った結果を示す図である。OXYTOCIN RECEPTOR (P97926) に対して 34% の相同性を示した。

図 6 は、「GPRv47」アミノ酸配列を「Query」にして、SWISS-PROT 全配列に対する BLAST 検索を行った結果を示す図である。GPRX_ORYLA-PROBABLE G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR (Q91178) に対して 43% の相同性を示した。

図 7 は、「GPRv51」アミノ酸配列を「Query」にして、SWISS-PROT 全配列に対する BLAST 検索を行った結果を示す図である。PROBABLE G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR RTA (P23749) に対して 37% の相同性を示した。

図 8 は、「GPRv71」アミノ酸配列を「Query」にして、SWISS-PROT 全配列に対する BLAST 検索を行った結果を示す図である。P2Y PURINOCEPTOR 3 (P2Y3) (Q98907) に対して 45% の相同性を示した。

図 9 は、「GPRv72」アミノ酸配列を「Query」にして、SWISS-PROT 全配列に対する BLAST 検索を行った結果を示す図である。ALPHA-1A ADRENERGIC RECEPTOR (002824) に対して 30% の相同性を示した。

図 10 は、GPRv8 のハイドロパシープロットを示す図である。

図 11 は、GPRv8 と類似ファミリーとのアラインメントを示す図である。

‘*’ はその位置で全ての配列で完全に保存されていることを意味する。

‘.’ はその位置で次のようなグループの内のいずれかが保存されている事を意味する。{STA},{NEQX},{NHQK},{NDBQ},{QHRK},{MILV},{MILF},{HY},{FYW}

‘.’ はその位置で次のようなグループの内のいずれかが保存されている事を意味する。{CSA},{ATV},{SAG},{STNK},{STPA},{SGND},{SNDEQX},{NDEQHX},{NEQHX}

図 12 は、図 11 の続きである。

図 13 は、GPRv12 のハイドロパシープロットを示す図である。

図 14 は、GPRv12 と AF208288 のアラインメントを示す図である。

‘*’ はその位置で全ての配列で完全に保存されていることを意味する。

‘.’ はその位置で次のようなグループの内のいずれかが保存されている事を意味する。{STA},{NEQX},{NHQK},{NDBQ},{QHRK},{MILV},{MILF},{HY},{FYW}

‘.’ はその位置で次のようなグループの内のいずれかが保存されている事を意味する。{CSA},{ATV},{SAG},{STNK},{STPA},{SGND},{SNDEQX},{NDEQHX},{NEQHX}

図 15 は、GPRv16 のハイドロパシープロットを示す図である。

図 16 は、GPRv16 の HMPFAM、膜貫通領域および S-S 結合についてまとめた図である。

***はHMPFAMの結果7_{tm}1とアサインされた領域を示す。

###は膜貫通領域を示す。

@はS-S結合を形成するCysを示す。

図 17 は、GPRv21 のハイドロパシープロットを示す図である。

図 18 は、GPRv21 とその類似タンパクのアラインメントを示す図である。

‘*’ はその位置で全ての配列で完全に保存されていることを意味する。

‘.’ はその位置で次のようなグループの内のいずれかが保存されている事を意味する。{STA},{NEQX},{NHQK},{NDBQ},{QHRK},{MILV},{MILF},{HY},{FYW}

‘.’ はその位置で次のようなグループの内のいずれかが保存されている事を意味する。{CSA},{ATV},{SAG},{STNK},{STPA},{SGND},{SNDEQX},{NDEQHX},{NEQHX}

図 19 は、図 18 の続きである。

図 20 は、GPRv40 のハイドロパシープロットを示す図である。

図 21 は、GPRv40 の HMPFAM、膜貫通領域および S-S 結合についてまとめた図である。

***はHMPFAMの結果7tm_1とアサインされた領域を示す。

###は膜貫通領域を示す。

@は S-S 結合を形成する Cys を示す。

図 22 は、GPRv47 のハイドロパシープロットを示す図である。

図 23 は、GPRv47 とその類似タンパクのアラインメントを示す図である。

'*' はその位置で全ての配列で完全に保存されていることを意味する。

'.' はその位置で次のようなグループの内のいずれかが保存されている事を意味する。{STA},{NEQK},{NHQK},{NDBQ},{QHRK},{MILV},{MILF},{HY},{FYW}

'.' はその位置で次のようなグループの内のいずれかが保存されている事を意味する。{CSA},{ATV},{SAG},{STNK},{STPA},{SGND},{SNDEQK},{NDEQHK},{N EQHRE}

図 24 は、図 23 の続きである。

図 25 は、図 24 の続きである。

図 26 は、GPRv51 のハイドロパシープロットを示す図である。

図 27 は、GPRv51 と類似タンパクとのアラインメントを示す図である。

'*' はその位置で全ての配列で完全に保存されていることを意味する。

'.' はその位置で次のようなグループの内のいずれかが保存されている事を意味する。{STA},{NEQK},{NHQK},{NDBQ},{QHRK},{MILV},{MILF},{HY},{FYW}

'.' はその位置で次のようなグループの内のいずれかが保存されている事を意味する。{CSA},{ATV},{SAG},{STNK},{STPA},{SGND},{SNDEQK},{NDEQHK},{N EQHRE}

図 28 は、GPRv71 のハイドロパシープロットを示す図である。

図 29 は、GPRv71 とその類似タンパクのアラインメントを示す図である。

'*' はその位置で全ての配列で完全に保存されていることを意味する。

'.' はその位置で次のようなグループの内のいずれかが保存されている事を意味する。{STA},{NEQK},{NHQK},{NDBQ},{QHRK},{MILV},{MILF},{HY},{FYW}

'.' はその位置で次のようなグループの内のいずれかが保存されている事を意味する。{CSA},{ATV},{SAG},{STNK},{STPA},{SGND},{SNDEQK},{NDEQHK},{N EQHRE}

図 30 は、図 29 の続きである。

図 31 は、GPRv72 のハイドロパシープロットを示す図である。

図 32 は、GPRv72 とその類似タンパクのアラインメントを示す図である。

'*' はその位置で全ての配列で完全に保存されていることを意味する。

'.' はその位置で次のようなグループの内のいずれかが保存されている事を意味する。{STA},{NEQK},{NHQK},{NDBQ},{QHRK},{MILV},{MILF},{HY},{FYW}

'.' はその位置で次のようなグループの内のいずれかが保存されている事を意味する。{CSA},{ATV},{SAG},{STNK},{STPA},{SGND},{SNDEQK},{NDEQHK},{N EQHRE}

図 33 は、図 32 の続きである。

図 34 は、図 33 の続きである。

発明を実施するための最良の形態

次に、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明は下記実施例に限定されるものではない。なお、特に断りがない場合は、公知の方法 (Maniatis, T. et al. (1982): "Molecular Cloning - A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory, NY) に従って実施可能である。

【実施例 1】 新規 G 蛋白質共役型受容体をコードする遺伝子の単鎖

本発明の新規 G 蛋白質共役型受容体 (GPRv8, GPRv12, GPRv16, GPRv21, GPRv40, GPRv47, GPRv51, GPRv71, GPRv72) をコードする全長 cDNA は、PCR により取得した。

新規 G 蛋白質共役型受容体 GPRv8 の増幅にはヒト胎児由来の Marathon Ready cDNA (Clontech 社) を鋳型 cDNA に、フォワードプライマーとして 5'-ATGCCAGC CAACTTCACAGAGGGCAGCT-3' (配列番号: 9)、リバースプライマーとして 5'-CTA GATGAATTCTGGCTTGGACAGAATC-3' (配列番号: 10) を用いた。PCR は Pyrobest DNA polymerase (宝酒造) を用い、94℃ (2.5 分) の後、94℃ (30 秒) / 60℃ (30 秒) / 72℃ (1 分) のサイクルを 25 回繰り返した。その結果、約 1.1 kbp の DNA 断片が増幅された。この断片を pCR2.1 plasmid (Invitrogen 社) を用いてクローニングした。得られたクローンの塩基配列はジデオキシターミネーター法により ABI377 DNA Sequencer (Applied Biosystems 社) を用いて解析した。明らかになった配列を配列番号: 5 に示す。

同配列は 1116 塩基のオープンリーディングフレーム (配列番号: 5 の第 1 番目から第 1116 番目) を持っている。オープンリーディングフレームから予測されるアミノ酸配列 (371 アミノ酸) を配列番号: 1 に示す。予想アミノ酸配列は、G 蛋白質共役型受容体の特徴である 7 個の膜貫通ドメインと思われる疎水性領域を有していることから、本遺伝子が G 蛋白質共役型受容体をコードすることが判明した。

新規 G 蛋白質共役型受容体 GPRv12 の増幅にはヒト胎児由来の Marathon Ready cDNA (Clontech 社) を鋳型 cDNA に、フォワードプライマーとして 5'-ATGGG CCCCAGGAGGCGCTGCTGCGCG-3' (配列番号: 11)、リバースプライマーとして 5'-TCAGTGTGTCTGCTGCGAGGAATCA-3' (配列番号: 12) を用いた。PCR は Pyrobest DNA polymerase (宝酒造) を用い 5% ホルムアミド存在下で、94℃ (2.5 分) の後、94℃ (5 秒) / 72℃ (4 分) のサイクルを 5 回、94℃ (5 秒) / 70℃ (4 分) のサイクルを 5 回、94℃ (5 秒) / 68℃ (4 分) のサイクルを 25 回繰り返した。

した。その結果、約 1.1 kbp の DNA 断片が増幅された。この断片を pCR2.1 plasmid (Invitrogen 社) を用いてクローニングした。得られたクローンの塩基配列は、ジデオキシターミネーター法により ABI377 DNA Sequencer (Applied Biosystems 社) を用いて解析した。明らかになった配列を配列番号: 6 に示す。

同配列は 1092 塩基のオープンリーディングフレーム (配列番号: 6 の第 1 番目から第 1092 番目) を持っている。オープンリーディングフレームから予測されるアミノ酸配列 (363 アミノ酸) を配列番号: 2 に示す。予想アミノ酸配列は、G 蛋白質共役型受容体の特徴である 7 個の膜貫通ドメインと思われる疎水性領域を有していることから、本遺伝子が G 蛋白質共役型受容体をコードすることが判明した。

新規 G 蛋白質共役型受容体 GPRv16 の増幅にはヒト胎児由来の Marathon Ready cDNA (Clontech 社) を鋳型 cDNA に、フォワードプライマーとして 5'-ATGCTGGCA GCTGCCTTGGCAGACTCTAAC-3' (配列番号: 13)、リバースプライマーとして 5'-CTATTAAACAGCTTCCCTGCTCTTGATC-3' (配列番号: 14) を用いた。PCR は Pyrobest DNA polymerase (宝酒造) を用い、94℃ (2 分) の後、94℃ (30 秒) / 60℃ (30 秒) / 72℃ (1 分) のサイクルを 30 回繰り返した。その結果、約 1.2 kbp の DNA 断片が増幅された。この断片を pCR2.1 plasmid (Invitrogen 社) を用いてクローニングした。得られたクローンの塩基配列はジデオキシターミネーター法により ABI377 DNA Sequencer (Applied Biosystems 社) を用いて解析した。明らかになった配列を配列番号: 7 に示す。

同配列は 1260 塩基のオープンリーディングフレーム (配列番号: 7 の第 1 番目から第 1260 番目) を持っている。オープンリーディングフレームから予測されるアミノ酸配列 (419 アミノ酸) を配列番号: 3 に示す。予想アミノ酸配列は、G 蛋白質共役型受容体の特徴である 7 個の膜貫通ドメインと思われる疎水性領域を有していることから、本遺伝子が G 蛋白質共役型受容体をコードすることが判明した。

新規 G 蛋白質共役型受容体 GPRv21 の増幅にはヒト胎児由来の Marathon Ready cDNA (Clontech 社) を鋳型 cDNA に、フォワードプライマーとして 5'-ATGGAGA CCACCATGGGGTTCATGGATG-3' (配列番号: 15)、リバースプライマーとして 5'-TTATTTTATGCTGATGACGTCACCTCTTC-3' (配列番号: 16) を用いた。PCR は Pyrobest DNA polymerase (宝酒造) を用い、5% ホルムアミド存在下で、94°C (2.5 分) の後、94°C (5 秒) / 72°C (4 分) のサイクルを 5 回、94°C (5 秒) / 70°C (4 分) のサイクルを 5 回、94°C (5 秒) / 68°C (4 分) のサイクルを 25 回繰り返した。その結果、約 1.2 kbp の DNA 断片が増幅された。この断片を pCR2.1 plasmid (Invitrogen 社) を用いてクローニングした。得られたクローンの塩基配列はジデオキシターミネーター法により ABI377 DNA Sequencer (Applied Biosystems 社) を用いて解析した。明らかになった配列を配列番号: 8 に示す。

同配列は 1182 塩基のオープンリーディングフレーム (配列番号: 8) を持っている。オープンリーディングフレームから予測されるアミノ酸配列 (393 アミノ酸) を配列番号: 4 に示す。予想アミノ酸配列は、G 蛋白質共役型受容体の特徴である 7 個の膜貫通ドメインと思われる疎水性領域を有していることから、本遺伝子が G 蛋白質共役型受容体をコードすることが判明した。

新規 G 蛋白質共役型受容体 GPRv40 の増幅にはヒト胎児由来の Marathon Ready cDNA (Clontech 社) を鋳型 cDNA に、フォワードプライマーとして 5'-ATGGAGG ATCTCTTTAGGCCCTCAATTC-3' (配列番号: 27)、リバースプライマーとして 5'-CTAGAAGGCACTTTTCGACGAGCAAGGC-3' (配列番号: 28) を用いた。PCR は Pyrobest DNA polymerase (宝酒造) を用い、5% ホルムアミド存在下で、98°C (2.5 分) の後、98°C (5 秒) / 72°C (4 分) のサイクルを 5 回、98°C (5 秒) / 70°C (4 分) のサイクルを 5 回、98°C (5 秒) / 68°C (4 分) のサイクルを 25 回繰り返した。その結果、約 1.3 kbp の DNA 断片が増幅された。この断片を pCR 2.1 plasmid (Invitrogen 社) を用いてクローニングした。得られたクローンの塩基配列はジデオキシターミネーター法により ABI377 DNA Sequencer (Applied

AAGCCCCCATCTCATTGGTGCCACG-3' (配列番号: 32) を用いた。PCR は Pyrobest DNA polymerase (宝酒造) を用い、98°C (2.5 分) の後、98°C (30 秒) / 50°C (30 秒) / 68°C (4 分) のサイクルを 35 回繰り返した。その結果、約 1.0 kbp の DNA 断片が増幅された。この断片を pCR2.1 plasmid (Invitrogen 社) を用いてクローニングした。得られたクローンの塩基配列はジデオキシターミネーター法により ABI377 DNA Sequencer (Applied Biosystems 社) を用いて解析した。明らかになった配列を配列番号: 24 に示す。

同配列は 966 塩基のオープンリーディングフレーム (配列番号: 24) を持っている。オープンリーディングフレームから予測されるアミノ酸配列 (321 アミノ酸) を配列番号: 19 に示す。予想アミノ酸配列は、G 蛋白質共役型受容体の特徴である 7 個の膜貫通ドメインと思われる疎水性領域を有していることから、本遺伝子が G 蛋白質共役型受容体をコードすることが判明した。

新規 G 蛋白質共役型受容体 GPRv71 の増幅にはヒト胎児由来の Marathon Ready cDNA (Clontech 社) を鋳型 cDNA に、フォワードプライマーとして 5'-ATGGAGA AGGTGGACATGAATACATCAC-3' (配列番号: 33)、リバースプライマーとして 5'-TTACCCAGATCTGTTCAACCTGGGCATC-3' (配列番号: 34) を用いた。PCR は Pyrobest DNA polymerase (宝酒造) を用い、94°C (2.5 分) の後、98°C (5 秒) / 72°C (4 分) のサイクルを 5 回、98°C (5 秒) / 70°C (4 分) のサイクルを 5 回、98°C (5 秒) / 68°C (4 分) のサイクルを 25 回繰り返した。その結果、約 1.0 kbp の DNA 断片が増幅された。この断片を pCR2.1 plasmid (Invitrogen 社) を用いてクローニングした。得られたクローンの塩基配列はジデオキシターミネーター法により ABI377 DNA Sequencer (Applied Biosystems 社) を用いて解析した。明らかになった配列を配列番号: 25 に示す。

同配列は 1002 塩基のオープンリーディングフレーム (配列番号: 25) を持っている。オープンリーディングフレームから予測されるアミノ酸配列 (333 アミノ酸) を配列番号: 20 に示す。予想アミノ酸配列は、G 蛋白質共役型受容体

Biosystems 社) を用いて解析した。明らかになった配列を配列番号: 22 に示す。

同配列は 1305 塩基のオープンリーディングフレーム (配列番号: 22) を持っている。オープンリーディングフレームから予測されるアミノ酸配列 (434 アミノ酸) を配列番号: 17 に示す。予想アミノ酸配列は、G 蛋白質共役型受容体の特徴である 7 個の膜貫通ドメインと思われる疎水性領域を有していることから、本遺伝子が G 蛋白質共役型受容体をコードすることが判明した。

新規 G 蛋白質共役型受容体 GPRv47 の増幅にはヒト胎児由来の Marathon Ready cDNA (Clontech 社) を鋳型 cDNA に、フォワードプライマーとして 5'-ATGGA GTCTCACCCTATCCCGAGTCATC-3' (配列番号: 29)、リバースプライマーとして 5'-TCATGACTCCAGCGGGGTGAGCGGCAG-3' (配列番号: 30) を用いた。PCR は Pyrobest DNA polymerase (宝酒造) を用い、5% ホルムアミド存在下で、94°C (2 分) の後、94°C (30 秒) / 50°C (30 秒) / 72°C (1.5 分) のサイクルを 35 回繰り返した。その結果、約 1.4 kbp の DNA 断片が増幅された。この断片を pCR 2.1 plasmid (Invitrogen 社) を用いてクローニングした。得られたクローンの塩基配列はジデオキシターミネーター法により ABI377 DNA Sequencer (Applied Biosystems 社) を用いて解析した。明らかになった配列を配列番号: 23 に示す。

同配列は 1356 塩基のオープンリーディングフレーム (配列番号: 23) を持っている。オープンリーディングフレームから予測されるアミノ酸配列 (451 アミノ酸) を配列番号: 18 に示す。予想アミノ酸配列は、G 蛋白質共役型受容体の特徴である 7 個の膜貫通ドメインと思われる疎水性領域を有していることから、本遺伝子が G 蛋白質共役型受容体をコードすることが判明した。

新規 G 蛋白質共役型受容体 GPRv51 の増幅にはヒト胎児由来の Marathon Ready cDNA (Clontech 社) を鋳型 cDNA に、フォワードプライマーとして 5'-ATGAACC AGACTTTGAATGACAGTGG-3' (配列番号: 31)、リバースプライマーとして 5'-TC

の特徴である 7 個の膜貫通ドメインと思われる疎水性領域を有していることから、本遺伝子が G 蛋白質共役型受容体をコードすることが判明した。

新規 G 蛋白質共役型受容体 GPRv72 の増幅にはヒト胎児由来の Marathon Ready cDNA (Clontech 社) を鋳型 cDNA に、フォワードプライマーとして 5'-ATGACGTCCACCTGCACCAACAGCAGC-3' (配列番号: 35)、リバースプライマーとして 5'-TCAAGGAAAGTAGCAGAAT CGTAGGAAG-3' (配列番号: 36) を用いた。PCR は Pyrobest DNA polymerase (宝酒造) を用い、94°C (2 分) の後、94°C (30 秒) / 55°C (30 秒) / 68°C (4 分) のサイクルを 30 回繰り返した。その結果、約 1.5 kbp の DNA 断片が増幅された。この断片を pCR2.1 plasmid (Invitrogen 社) を用いてクローニングした。得られたクローンの塩基配列はジデオキシターミネーター法により ABI377 DNA Sequencer (Applied Biosystems 社) を用いて解析した。明らかになった配列を配列番号: 26 に示す。

同配列は 1527 塩基のオープンリーディングフレーム (配列番号: 26) を持っている。オープンリーディングフレームから予測されるアミノ酸配列 (508 アミノ酸) を配列番号: 21 に示す。予想アミノ酸配列は、G 蛋白質共役型受容体の特徴である 7 個の膜貫通ドメインと思われる疎水性領域を有していることから、本遺伝子が G 蛋白質共役型受容体をコードすることが判明した。

【実施例 2】 新規 G 蛋白質共役型受容体のアミノ酸配列での SWISS-PROT に対する BLAST 検索

「GPRv8」のアミノ酸配列での SWISS-PROT に対する BLAST 検索結果を図 1 に示した。「GPRv8」は既知 G 蛋白質共役型受容体の中では HUMAN VASOPRESSIN V1 B RECEPTOR (P47901, 424aa) に対して、36% で最も高い相同性を示した。このことから「GPRv8」が新規 G 蛋白質共役型受容体であることが判明した。

「GPRv12」のアミノ酸配列での SWISS-PROT に対する BLAST 検索結果を図 2 に示した。「GPRv12」は既知 G 蛋白質共役型受容体の中では RAT 5-HYDROXYTRYPTA

NINE 6 RECEPTOR (P31388, 436aa)に対して、27%で最も高い相同性を示した。このことから「GPRv12」が新規 G 蛋白質共役型受容体であることが判明した。

「GPRv16」のアミノ酸配列での SWISS-PROT に対する BLAST 検索結果を図 3 に示した。「GPRv16」は既知 G 蛋白質共役型受容体の中では MOUSE GALANIN RECEPTOR TYPE 1 (P56479, 348aa)に対して、28%で最も高い相同性を示した。このことから「GPRv16」が新規 G 蛋白質共役型受容体であることが判明した。

「GPRv21」のアミノ酸配列での SWISS-PROT に対する BLAST 検索結果を図 4 に示した。「GPRv21」は既知 G 蛋白質共役型受容体の中では「GPRv21」は既知 G 蛋白質共役型受容体の中では BOVIN NEUROPEPTIDE Y RECEPTOR TYPE 2 (P79113, 384aa)に対して 30%で最も高い相同性を示した。このことから「GPRv21」が新規 G 蛋白質共役型受容体であることが判明した。

「GPRv40」のアミノ酸配列での SWISS-PROT に対する BLAST 検索結果を図 5 に示した。「GPRv40」は既知 G 蛋白質共役型受容体の中では同一なものは存在せず、OXYTOCIN RECEPTOR (P97926, 388aa)に対して 34%で最も高い相同性を示した。このことから「GPRv40」が新規 G 蛋白質共役型受容体であることが判明した。

「GPRv47」のアミノ酸配列での SWISS-PROT に対する BLAST 検索結果を図 6 に示した。「GPRv47」は既知 G 蛋白質共役型受容体の中では同一なものは存在せず、GPRX_ORYLA PROBABLE G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR (Q91178, 428aa)に対して 43%で最も高い相同性を示した。このことから「GPRv47」が新規 G 蛋白質共役型受容体であることが判明した。

「GPRv51」のアミノ酸配列での SWISS-PROT に対する BLAST 検索結果を図 7 に示した。「GPRv51」は既知 G 蛋白質共役型受容体の中では同一なものは存在せず、PROBABLE G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR RTA (P23749, 343aa)に対して 37%で最も高い相同性を示した。このことから「GPRv51」が新規 G 蛋白質共役型受容体であることが判明した。

G12.903R : ACCGCCCTTGCTGTAGGTGAG (配列番号 : 41)

TaqMan プローブ GPRv12.834T:TCGTGCCCTTCGTGACCGTGAA (配列番号 : 42)

GPRv16 用合成 DNA

PCR プライマー G16.1133F : CCCAGCATCCATACGAGAAA (配列番号 : 43)

G16.1254R : CTGTGTCCTCTCATGCCAAA (配列番号 : 44)

TaqMan プローブ GPRv16.1193T:TGAGAAAGCAGAGATTCCCATCTTCCT (配列番号 : 45)

GPRv21 用合成 DNA

PCR プライマー G21.989F : TCGCCATGAGCAACGACAT (配列番号 : 46)

G21.1114R : CACTGGACTTACCGCCATTGT (配列番号 : 47)

TaqMan プローブ GPRv21.1064T:AGATCATGTCTCCACTGGAAGGCTTCT (配列番号 : 48)

GPRv40 用合成 DNA

PCR プライマー G40.16F : GGATCTCTTTAGCCCTCAATTC (配列番号 : 49)

G40.99R : AAGGTCAGGTTGAGACCCGAC (配列番号 : 50)

TaqMan プローブ GPRv40.53T:AACATTTCCTGCCACTTTGCTGG (配列番号 : 51)

GPRv47 用合成 DNA

PCR プライマー G47.1292F : GCTGTGACTTTGGAATCCCA (配列番号 : 52)

G47.1393R : ACGGAGGTAGCTGTGACATGA (配列番号 : 53)

TaqMan プローブ GPRv47.1336T:TGAGTTCTGGAGCAGCACTCACCA (配列番号 : 54)

GPRv51 用合成 DNA

PCR プライマー G51.190F : GGCTTTGCAATGCACAGAA (配列番号 : 55)

G51.275R : GGAAGCCATGCTGAAGAGA (配列番号 : 56)

TaqMan プローブ GPRv51.214T:TTCTGCATCTATATCTCAACCTGGCGG (配列番号 : 57)

「GPRv71」のアミノ酸配列での SWISS-PROT に対する BLAST 検索結果を図 8 に示した。「GPRv71」は既知 G 蛋白質共役型受容体の中では同一なものは存在せず、Chicken P2Y PURINOCEPTOR 3 (P2Y3) (Q98907, 328aa)に対して 45%で最も高い相同性を示した。このことから「GPRv71」が新規 G 蛋白質共役型受容体であることが判明した。

「GPRv72」のアミノ酸配列での SWISS-PROT に対する BLAST 検索結果を図 9 に示した。「GPRv72」は既知 G 蛋白質共役型受容体の中では同一なものは存在せず、ALPHA-1A ADRENERGIC RECEPTOR (002824, 466aa)に対して 30%で最も高い相同性を示した。このことから「GPRv72」が新規 G 蛋白質共役型受容体であることが判明した。

【実施例 3】発現組織解析

1. 試薬

1.1 定最用 polymerase chain reaction (PCR)プライマー及び TaqMan プローブ : センスプライマー、アンチセンスプライマー、及び TaqMan プローブは PE Biosystems の遺伝子解析ソフトウェア Primer Express version 1.0 を用いて設計した。通常のプライマーはアマシャム・ファルマシア・バイオテック (東京) に、TaqMan プローブは PE Biosystems Japan に製造を依頼した。なお、TaqMan プローブは、5'端にはリポーター色素 FAM を、3'端にはクエンチャー-tamra を結合させた。プライマー及び TaqMan プローブの塩基配列を下に示す。

GPRv8 用合成 DNA

PCR プライマー G8.957F : CCAGGAGCGCTTTCTATGCTT (配列番号 : 37)

G8.1082R : TGTGATCTTTGCTCCCTGCA (配列番号 : 38)

TaqMan プローブ GPRv8.987T:TCAGAACCTGCCAGCATTTGAATAGTGCC (配列番号 : 39)

GPRv12 用合成 DNA

PCR プライマー G12.794F : ATCTGCTTTGCCCGGTATGT (配列番号 : 40)

GPRv71 用合成 DNA

PCR プライマー G71.746F : TGGCCTCTTACCCTCTGTTT (配列番号 : 58)

G71.841R : ATCAAGAGCTGGCAGTCTCTGA (配列番号 : 59)

TaqMan プローブ GPRv71.775T:TCCATATCAGCTGCTCTTCTACCTCACCA (配列番号 : 60)

GPRv72 用合成 DNA

PCR プライマー G72.101F : CCAAAATGCCATCAGCCT (配列番号 : 61)

G72.190R : GCACATGTTGGCGACAAA (配列番号 : 62)

TaqMan プローブ GPRv72.132T:CATCCGCTCAACGCTGCTGTTATCT (配列番号 : 63)

1.2 疾患由来 cDNA

同一患者の腫瘍および正常組織由来の cDNA は、Clontech の Matched cDNA Pairs を用いた。組織は肺、胃、結腸、卵巣、前立腺、子宮、および腎臓である。

腫瘍患者および正常成人の脳、脾臓、精巣、肝硬変患者および正常成人の肝臓、ループス病患者の腎臓、アルツハイマー病 (AD) 患者および正常成人の海馬及び前頭葉に由来する cDNA は、BioChain Institute から購入して用いた。

1.3 定量 PCR 反応用試薬 :

TaqMan Universal PCR Master Mix (PE Biosystems) を使用した。内部標準測定用として TaqMan β -actin Control Reagents (PE Biosystems) を用いた。

2. 定量 PCR 反応 :

1) 筋型 cDNA の希釈

BioChain の cDNA は水にて 50 倍希釈し、Clontech の cDNA は水にて 5 倍希釈して用いた。

2) マスターミックスの調製

以下の組成の反応溶液を調製した。

	反応容量	調製容量
2×Master Mix	12.5μl	1380μl
ヒソアライナー (50μM)	0.5μl	55.2μl
アタカアライナー (50μM)	0.5μl	55.2μl
TaqMan Probe (5μM)	1μl	110.4μl
鋳型 cDNA	2.5μl	
精製水	8μl	883.2μl
総量	25μl	2484μl

3) PCR 反応溶液の作成

マスターミックス溶液 54μl に鋳型 cDNA を 6μl 加えた後、定量 PCR 装置用の PCR プレートに 25μl ずつ duplicate でサンプル用ウェルに分注した。Non template control 用の 2 ウェルには上記マスターミックスを 25μl ずつ分注した。標準曲線の作成には pCEP4 ベクターにサブクローニングした cDNA を 100pg/μl から始めて 1/10 ずつ 8 段階希釈したものを利用した。2) のマスターミックス 54μl と Standard 液 6μl を加えたものから、25μl ずつを Standard 用ウェルに分注した。即ち、Standard 用ウェルには最も高濃度のもので 250pg、低濃度で 25ag (a: atto, 10⁻¹⁸) のプラスミド DNA が入ることになる。8 連のキャップを装着した後、軽く遠心し気泡を除いた。

4) PCR 反応

プレートを定量 PCR 装置 (GeneAmp 5700 Sequence Detection System: PE Biosystems) にセットし、以下の運転プログラムで反応させた。

- ① 50℃, 2 分 : 1 サイクル
 ② 95℃, 10 分 : 1 サイクル
 ③ 95℃, 15 秒 } : 50 サイクル
 60℃, 1 分 }

5) 定量解析

表 1

	GPRv8	GPRv12	GPRv16	GPRv21	GPRv40	GPRv47	GPRv51	GPRv71	GPRv72
Brain Normal	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Brain Tumor	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lung Normal	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lung Tumor	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Stomach Normal	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Stomach Tumor	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pancreas Normal	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pancreas Tumor	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cervix Normal	141	0	0	0	0	0	0	0	0
Cervix Tumor	141	0	0	0	0	0	0	0	0
Ovary Normal	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ovary Tumor	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Uterus Normal	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Uterus Tumor	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Prostate Normal	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Prostate Tumor	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Yeast Normal	16	0	0	0	0	0	0	0	0
Yeast Tumor	16	0	0	0	0	0	0	0	0
Kidney Normal	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kidney Tumor	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Liver Normal	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Liver Tumor	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Uterus Normal	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Uterus Tumor	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hepatic Normal	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hepatic Tumor	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Frontal lobe Normal	16	0	0	0	0	0	0	0	0
Frontal lobe Tumor	16	0	0	0	0	0	0	0	0

3 倍以上の発現変化が再現された場合、有意と考える。¹⁾ 印のある臓器由来 cDNA は BioChain から購入したものであり、印のない臓器由来 cDNA は Clontech から購入したものである。以下に、個々の遺伝子の疾患による発現変化をまとめる。

GPRv8 は正常の脾臓および子宮では発現が検出できなかったが、癌化で中等度発現した。結腸で強く発現するが、結腸癌でさらに強力に発現した。

GPRv12 は全体的に発現が弱かった。正常卵巣および精巣では発現が検出できなかったが、癌化で発現が検出できた。アルツハイマー病では海馬での発現が減少した。

GPRv16 は、結腸で発現しているが、癌化で発現が検出できなかった。脳では癌化で発現が増加した。肝臓では肝硬変により発現が検出できなかった。アルツハイマー病脳では海馬で発現が増強した。

GeneAmp 5700 の操作マニュアルに従い、定量解析を行い出力した。

3. 結果およびまとめ

ヒト正常および疾患患者の臓器由来 cDNA を用いた GPCR の発現プロファイルは、アクチン遺伝子の発現量を内部標準として相対的な比を求め、2 回の実験の平均を表 1 にまとめた。

GPRv21 は、発現は少ないが、癌化により結腸及び精巣での発現が検出できなかった。

GPRv40 は、癌化により脳、精巣での発現が増加した。肝硬変により発現が減少した。

GPRv47 は、癌化により脳、腎臓での発現が増加し、精巣での発現が減少した。肝臓での発現が肝硬変で検出できなかった。

GPRv51 は、結腸で強く発現しているが癌化により発現が減少した。精巣では癌化により発現が減少した。肝硬変の肝臓でも正常と比較して発現が減少した。脳では発現が弱い。アルツハイマー病において海馬で発現が増大した。

GPRv71 は、癌化により結腸および腎臓での発現が減少した。肝硬変の肝臓では発現が検出できなかった。アルツハイマー病では前頭葉での発現が減少した。

GPRv72 は、結腸では強く発現しているが癌化で発現が検出できなかった。脳では発現が弱い。アルツハイマー病の海馬で発現が増大した。

【実施例 4】 バイオインフォーマティクスによる GPRv8 の解析

1. GPRv8 のホモロジー検索

GPRv8 のアミノ酸配列を既知配列 (既知配列データベースとは、EMBL (Release 64, <http://www.ebi.ac.uk/>), GENBANK (Release 120.0, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), PIR (Release 66.00, <http://www-nbrf.georgetown.edu/pir/>) である) に対して解析プログラム (BLAST2.0) (Altschul, Stephen F. et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.) を用いて検索したところ、表 2 に示す配列とホモロジーを有することが明らかになった。GPRv8 は GPCR と同源性を有する、新規なクローンであることが判明した。GPRv8 のアミノ酸配列を既知配列に対して解析プログラム (blast2.0) を用いて検索した結果 (E-value が e-3 9 未満のもの) を表 2 に示す。

- 4 3 -

表 2

Hit (ID)	E-value	Identities %	Description
AE003754	2e-68	43	gene: "CG6111" - Drosophila melanogaster
AF147743	7e-43	33	vasotocin VTI receptor - Gallus gallus
AF184966	2e-42	33	arginine vasotocin receptor - Platichthys flesus
X93313	4e-42	36	mesotocin receptor - giant toad
X76321	8e-42	32	vasotocin receptor - white sucker
X87783	4e-41	33	isotocin receptor - white sucker
X64878	3e-40	32	oxytocin receptor - H.sapiens
U82440	7e-40	32	oxytocin receptor - Macaca mulatta

2. 膜貫通部位の予測

GP8v8 のアミノ酸配列を用いて Kyte-Doolittle の方法 (J. Kyte and R. F. Doolittle, (1982), *J. Mol. Biol.*, 157, 105-132.) によりハイドロパシープロットを作成し、膜貫通部位の予測を行った。その結果、GP8v8 は 7 個の膜貫通部位 (TM1~TM7) を有することが判明した (図 10)。

3. HMPfam 検索

GP8v8 のアミノ酸配列をクエリーとし、隠れマルコフモデルを用いた PFAM 検索 (HMPFAM (Sonnhammer EL, et al., *Nucleic Acids Res* 1998 Jan 1; 26(1): 320-322)) を行った。隠れマルコフモデルは HMMER version 2.1 (<http://hmmer.wustl.edu/>)、PFAM データベースは Pfam Version 5.5 (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/index.shtml>) を用いて検索した。

その結果、GP8v8 は、tm7_1 (Rhodopsin family) を有することが判明した。

表 3 に、HMPfam 検索の結果を示す。

- 4 5 -

表 4

Hit (ID)	E-value	Identities %	Description
AF208288	8e-88	50	orphan G protein-coupled receptor GPR26 - Rattus norvegicus
L03202	2e-17	24	5-hydroxytryptamine receptor - rat
L41146	5e-17	23	5-HT6 serotonin receptor - Rattus norvegicus
S62043	2e-16	25	serotonin receptor 6 - rat
L41147	2e-16	24	5-HT6 serotonin receptor - Homo sapiens
AF134158	4e-16	23	serotonin 6 receptor - Mus musculus
L14856	4e-16	26	somatostatin receptor 4 - Human
Y14627	5e-16	21	Dopamine receptor - Cyprinus carpio
L07833	6e-16	26	somatostatin receptor 4 - Homo sapiens
AF069547	8e-16	21	putative odorant receptor LOR4 - Lampetra fluviatilis

2. 膜貫通部位の予測

GP8v12 のアミノ酸配列を用いて Kyte-Doolittle の方法 (J. Kyte and R. F. Doolittle, (1982), *J. Mol. Biol.*, 157, 105-132.) によりハイドロパシープロットを作成し、膜貫通部位の予測を行った。その結果、GP8v12 は 7 個の膜貫通部位 (TM1~TM7) を有することが判明した (図 13)。

3. HMPfam 検索

GP8v12 のアミノ酸配列をクエリーとし、隠れマルコフモデルを用いた PFAM 検索 (HMPFAM (Sonnhammer EL, et al., *Nucleic Acids Res* 1998 Jan 1; 26(1): 320-322)) を行った。隠れマルコフモデルは HMMER version 2.1 (<http://hmmer.wustl.edu/>)、PFAM データベースは Pfam Version 5.5 (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/index.shtml>) を用いて検索した。

その結果、GP8v12 は、tm7_1 (Rhodopsin family) を有することが判明した。

表 5 に HMPfam 検索の結果を示す。

- 4 4 -

表 3

Hit	Score	Expect	Q from	Q to	Description
7tm_1	164.2	5.1e-51	66	330	7 transmembrane receptor (rhodopsin family)

Hit: 検索の結果推定されるドメインの名前。

Score: この値が高ければ高いほど信頼度が高い。

Expect: この値が 0 に近ければ近いほど信頼度が高い。

Q from: 推定されたドメインの開始位置

Q to: 推定されたドメインの終了位置

Description: 推定されたドメインの説明

4. アミノ酸配列のアライメント

Clustalw 1.7 を用いて GP8v8 と表 2 のタンパク質のアミノ酸配列のアライメントをおこなった (図 11、12)。GP8v8 は 7 個の膜貫通部位 (###) を有し、GPCR に特有の SS 結合を行うと考えられる Cys (●をつけた Cys) を有することが判明した。

[実施例 5] バイオインフォマティクスによる GP8v12 の解析

1. GP8v12 のホモロジー検索

GP8v12 のアミノ酸配列を既知配列 (既知配列データベースとは、EMBL (Release 64, <http://www.ebi.ac.uk/>), GENBANK (Release 120.0, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), PIR (Release 66.00, <http://www-nbrf.georgetown.edu/pir/>) である) に対して解析プログラム (BLAST2.0) (Altschul, Stephen F. et al., (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.) を用いて検索したところ、表 4 に示す配列とホモロジーを有することが明らかになった。GP8v12 は GPCR と相同性を有する、新規なクローンであることが判明した。GP8v12 のアミノ酸配列を既知配列に対して解析プログラム (blast2.0) を用いて検索した結果 (E-value が e-15 未満のもの) を表 4 に示す。

- 4 6 -

表 5

Hit	Score	Expect	Q from	Q to	Description
7tm_1	74.7	7.7e-23	22	294	7 transmembrane receptor (rhodopsin family)

Hit: 検索の結果推定されるドメインの名前。

Score: この値が高ければ高いほど信頼度が高い。

Expect: この値が 0 に近ければ近いほど信頼度が高い。

Q from: 推定されたドメインの開始位置

Q to: 推定されたドメインの終了位置

Description: 推定されたドメインの説明

4. アミノ酸配列のアライメント

Clustalw 1.7 を用いて GP8v12 と orphan G protein-coupled receptor GPR26 - Rattus norvegicus (AF208288) とのアミノ酸配列のアライメントをおこなった (図 14)。GP8v12 は 7 個の膜貫通部位 (###) を有し、GPCR に特有の SS 結合を行うと考えられる Cys (●をつけた Cys) を有することが判明した。

[実施例 6] バイオインフォマティクスによる GP8v16 の解析

1. GP8v16 のホモロジー検索

GP8v16 のアミノ酸配列を既知配列 (既知配列データベースとは、EMBL (Release 64, <http://www.ebi.ac.uk/>), GENBANK (Release 120.0, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), PIR (Release 66.00, <http://www-nbrf.georgetown.edu/pir/>) である) に対して解析プログラム (BLAST2.0) (Altschul, Stephen F. et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.) を用いて検索したところ、表 6 に示す配列とホモロジーを有することが明らかになった。GP8v16 は GPCR と相同性を有する、新規なクローンであることが判明した。GP8v16 のアミノ酸配列を既知配列に対して解析プログラム (blast2.0) を用いて検索した結果 (E-value が e-18 未満のもの) を表 6 に示す。

- 47 -

表 6

Hit (ID)	E-value	Identities %	Description
AF042784	4e-20	23	GALANIN RECEPTOR TYPE 2 - <i>Mus musculus</i>
U30290	4e-20	27	galanin receptor GALR1 - <i>Rattus norvegicus</i>
U90657	6e-20	27	GALANIN RECEPTOR TYPE 1 - mouse
AF042782	7e-20	25	galanin receptor type 2 - <i>Homo sapiens</i>
U94322	1e-19	24	galanin receptor type2 - <i>Rattus norvegicus</i>
AF077375	6e-19	23	galanin receptor type2 - <i>Mus musculus</i>

2. 膜貫通部位の予測

GPRv16 のアミノ酸配列を用いて Kyte-Doolittle の方法 (J. Kyte and R.F. Doolittle, (1982), *J. Mol. Biol.*, 157, 105-132.) によりハイドロパシープロットを作成し、膜貫通部位の予測を行った。その結果、GPRv16 は 7 個の膜貫通部位 (TM1~TM7) を有することが判明した (図 15)。

3. HMMPFam 検索

GPRv16 のアミノ酸配列をクエリーとし、隠れマルコフモデルを用いた PFAM 検索 (HMMPFAM (Sonnhammer EL, et al., *Nucleic Acids Res* 1998 Jan 1;26(1): 320-322)) を行った。隠れマルコフモデルは HMMER version 2.1 (<http://hmm.wustl.edu/>)、PFAM データベースは Pfam Version 5.5 (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/index.shtml>) を用いて検索した。

その結果、GPRv16 は、tm7_1 (Rhodopsin family) を有することが判明した。表 7 に、HMMPFam 検索の結果を示す。

- 48 -

表 7

Hit	Score	Expect	Q from	Q to	Description
7tm_1	23.8	8.3e-7	155	306	7 transmembrane receptor (rhodopsin family)
7tm_1	13.3	0.0017	53	133	7 transmembrane receptor (rhodopsin family)

Hit: 検索の結果推定されるドメインの名前。

Score: この値が高ければ高いほど信頼度が高い。

Expect: この値が 0 に近ければ近いほど信頼度が高い。

Q from: 推定されたドメインの開始位置

Q to: 推定されたドメインの終了位置

Description: 推定されたドメインの説明

4.

3. と 4. の結果を図 16 にまとめた。GPRv16 は GPCR に特徴的な S-S 結合を形成する Cys (#) を有することが判明した。

【実施例 7】 バイオインフォーマティクスによる GPRv21 の解析

1. GPRv21 のホモロジー検索

GPRv21 のアミノ酸配列を既知配列 (既知配列データベースとは、EMBL (Release 64, <http://www.ebi.ac.uk/>), GENBANK (Release 120.0, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), PIR (Release 66.00, <http://www-nbrf.georgetown.edu/pir/>) である) に対して解析プログラム (BLAST2.0) (Altschul, Stephen F. et al., (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.) を用いて検索したところ、表 8 に示す配列とホモロジーを有することが明らかになった。GPRv21 は GPCR と相同性を有する、新規なクローンであることが判明した。GPRv21 のアミノ酸配列を既知配列に対して解析プログラム (blast2.0) を用いて検索した結果 (E-value が e-35 未満のもの) を表 8 に示す。

- 49 -

表 8

Hit (ID)	E-value	Identities %	Description
AL121755	0.0	89	G-protein coupled receptor - Human
AF236082	0.0	83	G-protein coupled receptor GPR73 - <i>Mus musculus</i>
MB1490	9e-37	34	neuropeptide receptor - <i>D.melanogaster</i>
U50144	3e-36	30	type 2 neuropeptide Y receptor - <i>Bos taurus</i>
U42766	6e-36	29	neuropeptide y2 receptor - Human
AF037444	8e-36	28	cardioexcitatory receptor - <i>Lymanaea stagnalis</i>
D86238	8e-36	28	neuropeptide Y-Y2 receptor - <i>Mus musculus</i>
U42389	8e-36	29	neuropeptide Y-peptide YY receptor type 2 - human
U76254	8e-36	29	neuropeptide Y receptor type 2 - Human

2. 膜貫通部位の予測

GPRv21 のアミノ酸配列を用いて Kyte-Doolittle の方法 (J. Kyte and R.F. Doolittle, (1982), *J. Mol. Biol.*, 157, 105-132.) によりハイドロパシープロットを作成し、膜貫通部位の予測を行った。その結果、GPRv21 は 7 個の膜貫通部位 (TM1~TM7) を有することが判明した (図 17)。

3. HMMPFam 検索

GPRv21 のアミノ酸配列をクエリーとし、隠れマルコフモデルを用いた PFAM 検索 (HMMPFAM (Sonnhammer EL, et al., *Nucleic Acids Res* 1998 Jan 1;26(1): 320-322)) を行った。隠れマルコフモデルは HMMER version 2.1 (<http://hmm.wustl.edu/>)、PFAM データベースは Pfam Version 5.5 (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/index.shtml>) を用いて検索した。

その結果、GPRv21 は、tm7_1 (Rhodopsin family) を有することが判明した。表 9 に、HMMPFam 検索の結果を示す。

- 50 -

表 9

Hit	Score	Expect	Q from	Q to	Description
7tm_1	188.1	1.6e-58	79	338	7 transmembrane receptor (rhodopsin family)

Hit: 検索の結果推定されるドメインの名前。

Score: この値が高ければ高いほど信頼度が高い。

Expect: この値が 0 に近ければ近いほど信頼度が高い。

Q from: 推定されたドメインの開始位置

Q to: 推定されたドメインの終了位置

Description: 推定されたドメインの説明

4. アミノ酸配列のアライメント

Clustalv 1.7 を用いて GPRv21 と表 8 のタンパクとのアミノ酸配列のアライメントをおこなった (図 18、19)。GPRv8 は 7 個の膜貫通部位 (###) を有し、GPCR に特有の SS 結合を行うと考えられる Cys (#をつけた Cys) を有することが判明した。

【実施例 8】 バイオインフォーマティクスによる GPRv40 の解析

1. GPRv40 のホモロジー検索

GPRv40 のアミノ酸配列を既知配列 (既知配列データベースとは、EMBL (Release 64, <http://www.ebi.ac.uk/>), GENBANK (Release 120.0, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), PIR (Release 66.00, <http://www-nbrf.georgetown.edu/pir/>) である) に対して解析プログラム (BLAST2.0) (Altschul, Stephen F. et al., (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.) を用いて検索したところ、表 10 に示す配列とホモロジーを有することが明らかになった。GPRv40 は GPCR と相同性を有する、新規なクローンであることが判明した。GPRv40 のアミノ酸配列を既知配列に対して解析プログラム (blast2.0) を用いて検索した結果 (E-value が e-11 未満のもの) を表 10 に示す。

- 5 1 -

表 1 0

Hit (ID)	E-value	Identities %	Description
D86599	1e-13	23	oxytocin receptor - Mus sp.
U15280	4e-13	23	oxytocin receptor - Rattus norvegicus
X76321	1e-12	22	vasotocin receptor - white sucker
X64878	2e-12	21	oxytocin receptor - H.sapiens
X87783	2e-12	21	isotocin receptor - C.commersoni
D45400	3e-12	23	vasopressin receptor V1b - rat
L37112	3e-12	24	vasopressin receptor subtype 1b - Homo sapiens
U27322	6e-12	23	arginine-vasopressin V1b receptor - Rattus norvegicus
U82440	6e-12	21	oxytocin receptor - Macaca mulatta

2. 膜貫通部位の予測

GPBv40 のアミノ酸配列を用いて Kyte-Doolittle の方法 (J. Kyte and R. F. Doolittle, (1982), *J. Mol. Biol.*, 157, 105-132.) によりハイドロパシープロットを作成し、膜貫通部位の予測を行った。その結果、GPBv40 は 7 個の膜貫通部位 (TM1~TM7) を有することが判明した (図 2 0)。

3. HMMPFam 検索

GPBv40 のアミノ酸配列をクエリーとし、隠れマルコフモデルを用いた PFAM 検索 (HMMPFAM (Sonnhammer EL, et al., *Nucleic Acids Res* 1998 Jan 1; 26(1): 320-322)) を行った。隠れマルコフモデルは HMMER version 2.1 (<http://hmm.wustl.edu/>)、PFAM データベースは Pfam Version 5.5 (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/index.shtml>) を用いて検索した。

その結果、GPBv40 は、tm7_1 (Rhodopsin family) を有することが判明した。表 1 1 に、HMMPFam 検索の結果を示す。

- 5 3 -

表 1 2

Hit (ID)	E-value	Identities %	Description
D43633	1e-85	41	G protein-coupled seven-transmembrane receptor - Medaka fish
X98133	2e-28	27	histamine H2 receptor - H.sapiens
M32701	3e-28	28	histamine H2 receptor - Canine histamine
L41147	6e-28	31	5-HT6 serotonin receptor - Homo sapiens
U25440	8e-28	26	histamine H2 receptor - Cavia porcellus
D49783	1e-27	28	histamine H2 receptor - Human
U64032	2e-27	27	alpha 1d adrenoceptor - Oryctolagus cuniculus
S73473	3e-27	28	beta 3-adrenergic receptor - rats
M74716	4e-27	28	beta-adrenergic receptor - Rat
S57565	6e-27	27	histamine H2-receptor - rats

2. 膜貫通部位の予測

GPBv47 のアミノ酸配列を用いて Kyte-Doolittle の方法 (J. Kyte and R. F. Doolittle, (1982), *J. Mol. Biol.*, 157, 105-132.) によりハイドロパシープロットを作成し、膜貫通部位の予測を行った。その結果、GPBv47 は 7 個の膜貫通部位 (TM1~TM7) を有することが判明した (図 2 2)。

3. HMMPFam 検索

GPBv47 のアミノ酸配列をクエリーとし、隠れマルコフモデルを用いた PFAM 検索 (HMMPFAM (Sonnhammer EL, et al., *Nucleic Acids Res* 1998 Jan 1; 26(1): 320-322)) を行った。隠れマルコフモデルは HMMER version 2.1 (<http://hmm.wustl.edu/>)、PFAM データベースは Pfam Version 5.5 (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/index.shtml>) を用いて検索した。

その結果、GPBv47 は、tm7_1 (Rhodopsin family) を有することが判明した。表 1 3 に、HMMPFam 検索の結果を示す。

- 5 2 -

表 1 1

Hit	Score	Expect	Q from	Q to	Description
7tm_1	26.5	1.1e-07	228	352	7 transmembrane receptor (rhodopsin family)
7tm_1	18.1	5e-05	59	181	7 transmembrane receptor (rhodopsin family)

Hit: 検索の結果推定されるドメインの名前。

Score: この値が高ければ高いほど信頼度が高い。

Expect: この値が 0 に近ければ近いほど信頼度が高い。

Q from: 推定されたドメインの開始位置

Q to: 推定されたドメインの終了位置

Description: 推定されたドメインの説明

4.

3. と 4. の結果を図 2 1 にまとめた。GPBv40 は GPCR に特徴的な S-S 結合を形成する Cys (8) を有することが判明した。

【実施例 9】 バイオインフォマティクスによる GPBv47 の解析

1. GPBv47 のホモロジー検索

GPBv47 のアミノ酸配列を既知配列 (既知配列データベースとは、EMBL (Release 64, <http://www.ebi.ac.uk/>), GENBANK (Release 120.0, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), PIR (Release 66.00, <http://www-nbrf.georgetown.edu/pir/>) である) に対して解析プログラム (BLAST2.0) (Altschul, Stephen F. et al., (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.) を用いて検索したところ、表 1 2 に示す配列とホモロジーを有することが明らかになった。GPBv47 は GPCR と相同性を有する、新規なクローンであることが判明した。GPBv47 のアミノ酸配列を既知配列に対して解析プログラム (blast2.0) を用いて検索した結果 (E-value が e-11 未満のもの) を表 1 2 に示す。

- 5 4 -

表 1 3

Hit	Score	Expect	Q from	Q to	Description
7tm_1	137.9	9.6e-43	59	341	7 transmembrane receptor (rhodopsin family)

Hit: 検索の結果推定されるドメインの名前。

Score: この値が高ければ高いほど信頼度が高い。

Expect: この値が 0 に近ければ近いほど信頼度が高い。

Q from: 推定されたドメインの開始位置

Q to: 推定されたドメインの終了位置

Description: 推定されたドメインの説明

4. アミノ酸配列のアライメント

Clustalv 1.7 を用いて GPBv47 と類似タンパクとのアミノ酸配列のアライメントをおこなった (図 2 3 ~ 2 5)。GPBv48 は 7 個の膜貫通部位 (###) を有し、GPCR に特有の SS 結合を行うと考えられる Cys (8) をつけた Cys を有することが判明した。

【実施例 10】 バイオインフォマティクスによる GPBv51 の解析

1. GPBv51 のホモロジー検索

GPBv51 のアミノ酸配列を既知配列 (既知配列データベースとは、EMBL (Release 64, <http://www.ebi.ac.uk/>), GENBANK (Release 120.0, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), PIR (Release 66.00, <http://www-nbrf.georgetown.edu/pir/>) である) に対して解析プログラム (BLAST2.0) (Altschul, Stephen F. et al., (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.) を用いて検索したところ、表 1 4 に示す配列とホモロジーを有することが明らかになった。GPBv51 は GPCR と相同性を有する、新規なクローンであることが判明した。GPBv51 のアミノ酸配列を既知配列に対して解析プログラム (blast2.0) を用いて検索した結果 (E-value が e-18 未満のもの) を表 1 4 に示す。

表 1 4

Hit (ID)	E-value	Identities %	Description
M35297	4e-43	36	G-protein coupled receptor - Rat
J03823	1e-42	34	Rat mas oncogene, complete cds.
M13150	3e-40	34	mas proto-oncogene - Human
X67735	1e-39	35	Mas proto-oncogene - M.musculus mas
AL035542	1e-35	36	MAS-related G protein-coupled receptor MRG - Human

2. 膜貫通部位の予測

GPBv51のアミノ酸配列を用いて Kyte-Doolittle の方法(J.Kyte and R.F.Doolittle, (1982), *J.Mol.Biol.*, 157,105-132.)によりハイドロパシープロットを作成し、膜貫通部位の予測を行った。その結果、GPBv51は7個の膜貫通部位(TM1~TM7)を有することが判明した(図26)。

3. HMMPFAM 検索

GPBv51のアミノ酸配列をクエリーとし、隠れマルコフモデルを用いた PFAM 検索 (HMMPFAM(Sonnhammer EL, et al., *Nucleic Acids Res* 1998 Jan 1;26(1):320-322))を行った。隠れマルコフモデルは HMMER version2.1(<http://hmmer.wustl.edu/>)、PFAM データベースは Pfam Version 5.5 (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/index.shtml>)を用いて検索した。

その結果、GPBv51は、tm7_1 (Rhodopsin family)を有することが判明した。表15にHMMPFAM検索の結果を示す。

表 1 5

Hit	Score	Expect	Q from	Q to	Description
7tm_1	32.6	1.4e-09	44	78	7 transmembrane receptor (rhodopsin family)
7tm_1	30.1	8.7e-09	104	276	7 transmembrane receptor (rhodopsin family)

Hit: 検索の結果推定されるドメインの名前。

表 1 6

Hit (ID)	E-value	Identities %	Description
AF069555	9e-44	44	G protein-coupled receptor p2y3 - Meleagris gallopavo
X98283	9e-44	45	P2Y PURINOCEPTOR 3 - G.domesticus
AF031897	6e-41	40	P2Y nucleotide receptor - Meleagris gallopavo
X99953	1e-39	41	P2Y PURINOCEPTOR 8 - X.laevis
D63665	2e-37	41	novel G protein-coupled P2 receptor - Rat
Y14705	1e-36	40	P2Y4 receptor gene - Rattus norvegicus
AJ277752	2e-36	41	P2Y4 receptor - Mus musculus

2. 膜貫通部位の予測

GPBv71のアミノ酸配列を用いて Kyte-Doolittle の方法(J.Kyte and R.F.Doolittle, (1982), *J.Mol.Biol.*, 157,105-132.)によりハイドロパシープロットを作成し、膜貫通部位の予測を行った。その結果、GPBv71は7個の膜貫通部位(TM1~TM7)を有することが判明した(図28)。

3. HMMPFAM 検索

GPBv71のアミノ酸配列をクエリーとし、隠れマルコフモデルを用いた PFAM 検索 (HMMPFAM(Sonnhammer EL, et al., *Nucleic Acids Res* 1998 Jan 1;26(1):320-322))を行った。隠れマルコフモデルは HMMER version2.1(<http://hmmer.wustl.edu/>)、PFAM データベースは Pfam Version 5.5 (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/index.shtml>)を用いて検索した。

その結果、GPBv71は、tm7_1 (Rhodopsin family)を有することが判明した。表17にHMMPFAM検索の結果を示す。

Score: この値が高ければ高いほど信頼度が高い。

Expect: この値が0に近ければ近いほど信頼度が高い。

Q from: 推定されたドメインの開始位置

Q to: 推定されたドメインの終了位置

Description: 推定されたドメインの説明

4. アミノ酸配列のアライメント

Clustalv1.7を用いてGPBv51とG-protein coupled receptor - Rat(M35297)とのアミノ酸配列のアライメントをおこなった(図27)。GPBv51は7個の膜貫通部位(###)を有することが判明した。

【実施例11】 バイオインフォーマティクスによる GPBv71 の解析

1. GPBv71 のホモロジー検索

GPBv71のアミノ酸配列を既知配列(既知配列データベースとは、EMBL(Release 64, <http://www.ebi.ac.uk/>), GENBANK(Release 120.0, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), PIR (Release 66.00, <http://www-nbrf.georgetown.edu/pir/>)である)に対して解析プログラム(BLAST2.0)(Altschul, Stephen F. et al., (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.)を用いて検索したところ、表16に示す配列とホモロジーを有することが明らかになった。GPBv71はGPCRと相同性を有する、新規なクローンであることが判明した。GPBv71のアミノ酸配列を既知配列に対して解析プログラム(blast2.0)を用いて検索した結果(E-valueがe-35未満のもの)を表16に示す。

表 1 7

Hit	Score	Expect	Q from	Q to	Description
7tm_1	90.6	7.6e-28	40	161	7 transmembrane receptor (rhodopsin family)

Hit: 検索の結果推定されるドメインの名前。

Score: この値が高ければ高いほど信頼度が高い。

Expect: この値が0に近ければ近いほど信頼度が高い。

Q from: 推定されたドメインの開始位置

Q to: 推定されたドメインの終了位置

Description: 推定されたドメインの説明

4. アミノ酸配列のアライメント

Clustalv1.7を用いてGPBv71とその類似タンパクとのアミノ酸配列のアライメントをおこなった(図29、30)。GPBv71は7個の膜貫通部位(###)を有することが判明した。

【実施例12】 バイオインフォーマティクスによる GPBv72 の解析

1. GPBv72 のホモロジー検索

GPBv72のアミノ酸配列を既知配列(既知配列データベースとは、EMBL(Release 64, <http://www.ebi.ac.uk/>), GENBANK(Release 120.0, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), PIR (Release 66.00, <http://www-nbrf.georgetown.edu/pir/>)である)に対して解析プログラム(BLAST2.0)(Altschul, Stephen F. et al., (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.)を用いて検索したところ、表18に示す配列とホモロジーを有することが明らかになった。GPBv72はGPCRと相同性を有する、新規なクローンであることが判明した。GPBv72のアミノ酸配列を既知配列に対して解析プログラム(blast2.0)を用いて検索した結果(E-valueがe-24未満のもの)を表18に示す。

- 59 -

表 18

Hit (ID)	E-value	Identities %	Description
AF091890	4e-29	32	G-protein coupled receptor REZ - Homo sapiens
U81982	3e-25	30	alpha 1a-adrenoceptor - Oryctolagus cuniculus
S71323	6e-25	32	alpha-1A adrenergic receptor - Japanese medaka
D63859	6e-25	32	alpha1A-adrenoceptor - Oryzias latipes
U07126	8e-25	29	alpha1c adrenergic receptor - Rattus norvegicus
U03866	8e-25	30	adrenergic alpha-1c receptor protein - Human
AF013261	8e-25	30	alpha 1A adrenergic receptor isoform 4 - Homo sapiens
L31774	8e-25	30	alpha-1C-adrenergic receptor - Human
D32202	8e-25	30	alpha 1C adrenergic receptor isoform 2 - Human
D32201	8e-25	30	alpha 1C adrenergic receptor isoform 3 - Human
D25235	8e-25	30	alpha1C adrenergic receptor

2. 膜貫通部位の予測

GPv72 のアミノ酸配列を用いて Kyte-Doolittle の方法 (J. Kyte and R. F. Doolittle, (1982), *J. Mol. Biol.*, 157, 105-132.) によりハイドロパシープロットを作成し、膜貫通部位の予測を行った。その結果、GPv72 は 7 個の膜貫通部位 (TM1~TM7) を有することが判明した (図 3 1)。

3. HMPfam 検索

GPv72 のアミノ酸配列をクエリーとし、隠れマルコフモデルを用いた PFAM 検索 (HMPFAM (Sonnhammer EL, et al., *Nucleic Acids Res* 1998 Jan 1;26(1): 320-322)) を行った。隠れマルコフモデルは HMMER version2.1 (<http://hmmur>).

- 61 -

する化合物は、本発明の 6 蛋白質共役型受容体蛋白質が関与する疾患の新しい予防薬や治療薬の開発への利用が期待される。

- 60 -

vustl.edu/), PFAM データベースは Pfam Version 5.5 (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/index.shtml>) を用いて検索した。

その結果、GPv72 は、tm_1 (Rhodopsin family) を有することが判明した。表 19 に、HMPfam 検索の結果を示す。

表 19

Hit	Score	Expect	Q from	Q to	Description
tm_1	196.1	4.7e-61	48	454	7 transmembrane receptor (rhodopsin family)

Hit: 検索の結果推定されるドメインの名前。

Score: この値が高ければ高いほど信頼度が高い。

Expect: この値が 0 に近ければ近いほど信頼度が高い。

Q from: 推定されたドメインの開始位置

Q to: 推定されたドメインの終了位置

Description: 推定されたドメインの説明

4. アミノ酸配列のアライメント

Clustalw1.7 を用いて GPv72 と表 18 のタンパクとのアミノ酸配列のアライメントをおこなった (図 3 2~3 4)。GPv72 は 7 個の膜貫通部位 (### ###) を有し、GPCR に特有の SS 結合を行うと考えられる Cys (●をつけた Cys) を有することが判明した。

産業上の利用の可能性

本発明により、新規 G 蛋白質共役型受容体 (GPv8, GPv12, GPv16, GPv21, GPv40, GPv47, GPv51, GPv71, GPv72)、該蛋白質をコードする遺伝子、該遺伝子を含むベクター、該ベクターを含む宿主細胞、該蛋白質の製造方法が提供された。さらに、該蛋白質の活性を修飾する化合物のスクリーニング方法が提供された。本発明の蛋白質やその遺伝子、または本発明の蛋白質の活性を修飾

- 62 -

請求の範囲

1. グアノシン三リン酸結合蛋白質共役型の受容体をコードする下記 (a) から (d) のいずれかに記載の DNA。
 - (a) 配列番号: 1 から 4、17 から 21 のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる蛋白質をコードする DNA。
 - (b) 配列番号: 5 から 8、22 から 26 のいずれかに記載の塩基配列のコード領域を含む DNA。
 - (c) 配列番号: 1 から 4、17 から 21 のいずれかに記載のアミノ酸配列において 1 もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および/または挿入したアミノ酸配列からなる蛋白質をコードする DNA。
 - (d) 配列番号: 5 から 8、22 から 26 のいずれかに記載の塩基配列からなる DNA にストリンジントな条件下でハイブリダイズする DNA。
2. 配列番号: 1 から 4、17 から 21 のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる蛋白質の部分ペプチドをコードする DNA。
3. 請求項 1 または 2 に記載の DNA を含有するベクター。
4. 請求項 1 または 2 に記載の DNA または請求項 3 に記載のベクターを保持する形質転換体。
5. 請求項 1 または 2 に記載の DNA によりコードされる蛋白質またはペプチド。
6. 請求項 4 に記載の形質転換体を培養し、該形質転換体またはその培養上清から発現させた蛋白質またはペプチドを回収する工程を含む、請求項 5 に記載の蛋白質またはペプチドの製造方法。
7. 請求項 5 に記載の蛋白質に結合するリガンドのスクリーニング方法であって、
 - (a) 請求項 5 に記載の蛋白質またはペプチドに被験試料を接触させる工程、

- (b) 該蛋白質またはペプチドに結合する化合物を選択する工程、を含む方法。
8. 請求項5に記載の蛋白質とそのリガンドとの結合を阻害する活性を有する化合物のスクリーニング方法であって、
- (a) 被検試料の存在下で請求項5に記載の蛋白質またはその部分ペプチドにリガンドを接触させ、該蛋白質またはその部分ペプチドとリガンドとの結合活性を検出する工程、
- (b) 被検試料非存在下での結合活性と比較して、工程(a)で検出された結合活性を低下させる化合物を選択する工程、を含む方法。
9. 請求項5に記載の蛋白質の活性を阻害または促進する化合物をスクリーニングする方法であって、
- (a) 被検試料の存在下で該蛋白質を発現する細胞に該蛋白質のリガンドを接触させる工程、
- (b) 該リガンドの該蛋白質への結合による細胞における変化を検出する工程、
- (c) 被検試料非存在下での細胞における変化と比較して、工程(b)で検出された細胞における変化を抑制または増強させる化合物を選択する工程、を含む方法。
10. 細胞における変化が、cAMP濃度の変化またはカルシウム濃度の変化である、請求項8または9に記載の方法。
11. 請求項5に記載の蛋白質に結合する抗体。
12. 請求項7から10のいずれかに記載のスクリーニングにより単離される化合物。
13. 請求項12に記載の化合物を有効成分とする医薬組成物。
14. 癌、肝硬変、およびアルツハイマー病からなる群より選択される疾患の治療のための、請求項13に記載の医薬組成物。

図1

```

>sp|P47901|VIBR_HUMAN VASOPRESSIN VIB RECEPTOR (AVPR VIB) (VASOPRESSIN V3
RECEPTOR) (AVPR V3) (ANTIDIURETIC HORMONE RECEPTOR 1B).
Length = 424
Score = 316 (111.2 bits), Expect = 3.7e-41, Sum P(2) = 3.7e-41
Identities = 70/194 (36%), Positives = 115/194 (59%)
Query: 56 LMYLFVFTYVGNVYVLFSTWRR-KKKSRMTFFVQLAITDSFTGLVNLTDIMWFTGDF 114
L + V GN VL + + +K+SRM FY LA+TD L +L + M T F
Sbjct: 41 LATVLVLTGMLAVLLTGLGKRKRSMHLFVLAALD LAVALFQVLPQLLWDITYRF 100
Query: 115 TAPOLVCRVRYVLYASTYVLSIDRYHAIVYVWFKLQGEKQARVLIVIA-WSL 173
POL+CR Y+YLOH+ +ASTY+L+++DRIY A+ +P+ LQ Q+ L++ A W L
Sbjct: 101 QGPOLLCAVYKLOVLSFASTYMLAMTLDYLAICHPLSLQGGOSTYLLIAAPWLL 160
Query: 174 SFLFSIPTLIIFGKRTL--SNGEVOCHALWPODSY-WTP--YMTIVAFVYFIPLTIIIS 228
+ +FSHP + IF R + +G+ CWA D + W P Y+T ++ +P+I+++
Sbjct: 161 AAIFSLPQVIFSLREVIQSGVLDCA--DFGFWSPRAYLTWITLAIIVLPVTLTA 217
Query: 229 MYGIVIRTIV--IKSKT 243
Y ++ I +K KT
Sbjct: 218 CYSLIGHEICKMLKYKT 234
Score = 131 (48.1 bits), Expect = 3.7e-41, Sum P(2) = 3.7e-41
Identities = 33/80 (41%), Positives = 47/80 (59%)
Query: 258 SSYNGLSIKAKIKAIKYSIIIIAFICQWSPYF--LFDLDNFLLPDTQERFYASVI 314
SS N IS+AKI+ +K + +I+L+I CWH+P+ + + D N PD A I
Sbjct: 267 SSINT--ISAKIKTYVMTFVILAYIACWAPFFSYQWSDX-NA-POEDSTNVAFTI 322
Query: 315 IQMLPALNSAINPLIYCVFSSSI 337
L LNS NP IV F+S +
Sbjct: 323 SMLLGRLNSCCNPVIYMGFNHL 345

```

15. 配列番号: 5から8、22から26のいずれかに記載の塩基配列からなるDNAまたはその相補鎖に相補的な、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を有するヌクレオチド。
16. 癌、肝硬変、およびアルツハイマー病からなる群より選択される疾患の診断方法であって、被検者由来の該疾患に関連した組織における請求項1に記載のDNAの発現、または被検者における請求項1に記載のDNAの変異追加しまたは検出することを含む方法。
17. 請求項11に記載の抗体または請求項15に記載のヌクレオチドを含む、癌、肝硬変、およびアルツハイマー病からなる群より選択される疾患の診断薬。

図2

```

>sp|P31388|SHB_RAT 5-HYDROXYTRYPTAMINE 6 RECEPTOR (5-HT-6) (SEROTONIN RECEPTOR)
(ST-817).
Length = 436
Score = 224 (78.9 bits), Expect = 6.7e-17, P = 6.7e-17
Identities = 84/309 (27%), Positives = 144/309 (46%)
Query: 3 PGEA--LLAGLLVWVLAVALLSNALVLLCCYSAELNTRASGVLLVNLGLHLLAALDM 60
PG + + A L V++ A ++ L+L C A LR S LVH L++ + M
Sbjct: 23 PGSGEMVAALCVVILTAARSLIIVLICTPA-LNR-TSFFLVSLFTSLMGLVVM 80
Query: 61 PFTLLGWMGRITSPAGCAOVIGFLOTFLASHAALSVAALSADOMLVGFPLRYAGRLR- 119
P +L + GR AGC + D S +L++ +S D+H+ + PLY R+
Sbjct: 61 PPAMLNLYGRWVLRGLCLLTAFDVMCCSASILMLCLISLDRYLLILSLRYKLRLTA 140
Query: 120 PRYAGLLLCAGMSQSLFSGAALGCSLVGYSSAFSCSLRPPPERPRFAA--FTATL 176
PR L+LG AW SLA AL S+L + P P + R A F
Sbjct: 141 PRALALILG-AW-SLA--ALA-SFLPLLGLHGLKARTPAPGCRLLASLPFLVA 192
Query: 177 HAVGFVLPLAVLCLSLQWHRVARRHCRQMTVTY--MKALLADLHPSYR-- 225
V F LP +C T ++ AR+ ++ +T +L + P +
Sbjct: 193 SGVTFPLPSGACFTYCRILLAAKQAVQVASLTGTAGDALETQVPRTPPGPESADS 252
Query: 226 QRCLIQKRRHRATRKIGIAIATFLICFAPYVMTLAEIIPFVTVNAGNGLSKGLTYS 265
+R + R+ +H+ +GI + F++ P+ + +H+ V + +L+ L Y
Sbjct: 253 RRLATWHSRKAALKASLTGLIGNFVFTVLPFFVAMIAQAVCCISPGFLDVLT-WGYC 311
Query: 286 KAVADPTYSLLRRPFRQL 305
+ +P Y L R F+ L
Sbjct: 312 NSTWNPITVPLPWFQKAL 331

```

3

>sp|P56479|GALR_MOUSE GALANIN RECEPTOR TYPE 1 (GAL1-R) (GALR1).
Length = 348

Score = 269 (94.7 bits), Expect = 7.9e-24, P = 7.9e-24
Identities = 82/289 (28%), Positives = 136/289 (47%)

Query: 49 VGVGNLCYIGILLRHAKGKP-SMHSILMLSLADLILLFSAPIRATAYSKSVLDG 107
+G +GN VI +L + GKP S + ILNLS+ADL+ LLF P +AT Y+ W LG
Sbjct: 46 MGVLGNSLVITVLARSK-PGKPRSTNLFILNLSIADLAILFCIPFQATVYALPTWVLG 104

Query: 108 WPCVCKSSDWFIHTOMAAKSLTIYVVA-KVCFMYASDPAAQVSIHRYTWSVLVAINTVA 165
F+CK +F M T+ ++ + + S + + + + V IW ++
Sbjct: 105 AFICKFIHYFFTVSMLYSIFTLAANSVDRYVAHSKRSSSLKYSKALLGVG-F-IWALS 163

Query: 166 SLLPLPENFFSTIRHESVE-MCLVDVPAVEEFMSFGKLYPL-LAFG-LPLFFASF 220
+ P + + H + + C - P + K Y + + FG LPL F
Sbjct: 164 IMAASPVAYHRLPHRDSNQTFCWQNP-KLHKAYVVTTFVGYLLPLLLICF 217

Query: 221 YFWRAYDOCKRGSTKTQNLKHOIRSKQVYMLLSIAISAVLWLPENVAHVMHKAAG 280
+ + + K+ K + + + K+ +L + + + WLP V LW A
Sbjct: 218 CYAKVLNHLHKK-LKMSKSEASKTAQTVLVVYVFGISMLPHMYHMAEF-GAF 274

Query: 281 PAPQGGFI-ALSQVLMFSISSANPLIFLYMSEEFREGLGKVMWITKKPPTVSESQE 337
P P F + L + S SS NP+ + +SE FR+ K V+K + + P SE+ +E
Sbjct: 275 PLTPASFFRITAMCLATYSSVNPFIYAFLESENFRKAYKQVFKCHVCDSEPR-SETKE 332

5

>sp|P97926|OXYR_MOUSE OXYTOCIN RECEPTOR (OT-R).
Length = 388

Score = 164 (57.7 bits), Expect = 8.9e-22, Sum P(2) = 8.9e-22
Identities = 57/166 (34%), Positives = 84/166 (50%)

Query: 24 VGLNLTGGGAP-ASGPPSR-RVRLVFLGVILVAVAGNTTVLCRLCGG 71
W + L LG G P +GPP R RV + L +L +A+ +GN VL L
Sbjct: 9 VSIELDLSGVPVPAEGNLTAGPPRRNEALARVEVAVLCLILFLALSNGACVLLAL- 64

Query: 72 GPMAGPKRRKIDFLLVQLALADLYACGGTALQZLWELLGEPRATGDLACRFLQLQAS 131
K ++ F + L+ADL L QL W+ R DL CR ++ LO
Sbjct: 65 -HTRHNSRLFFFMHLSIADLVYAVFQNLQLLDITF-RFYGPDLCLRLVKYLOV 121

Query: 132 GRGSAHLVYLIALERRRAVIRPHGRPLPARA-LAALG-WLALLLALPFAFY 182
G AS +L+L+L+R A+ P. R L R LAL WL L+ ++P +
Sbjct: 122 GWFASYTLILLMSLDRLAICDPL-RSLRRRTDRLAVLATVLCGLVASVPQVHI 174

Score = 155 (54.6 bits), Expect = 8.9e-22, Sum P(2) = 8.9e-22
Identities = 49/161 (30%), Positives = 85/161 (52%)

Query: 217 CHSIFAPLPRHILQVAYFAYEAVGFVAPVYVLGVACSHLS-VNM-RHRPOAPAAAA 272
C +F + W + Y + +A ++ PV VL AC L+S +W R + A AAAA
Sbjct: 187 CHAVF-IQPMFKAYVTWITLAVYIVPVYLA-ACYGLISFKIMNRLKATAAAAAAE 243

Query: 273 VSAAPG-RAPAPALPRAYQSLMSLALLLVGCELPYFAARLAAWS-SG 323
S + G R + + +AK+++H++ ++ L F+ C P+ F ++ W +
Sbjct: 244 GSDAAGAGRAALARVSSVYLISKAKIRTYNTFIIVLAFVCMTPFFVOMMSVMDVNA 303

Query: 324 PAGWEGEGLSAALRVVAMNSLNPVYLFQAGDCRLRGLRGLSLCCA 376
P C +A +A NS NP+ +F L HL +R LCC+
Sbjct: 304 PK-EASAFIIM+LLASLNSCCNPVITWLFTE-HLFELVQRF-LCCS 347

4

>sp|NY2R_BOVIN NEUROPEPTIDE Y RECEPTOR TYPE 2 (NPY2-R).
Length = 384

Score = 153 bits (383), Expect = 5e-37
Identities = 93/308 (30%), Positives = 164/308 (53%), Gaps = 7/308 (2%)

Query: 47 DEDEDVNSKRTFFAAKIVIGMALVGIMLVGSGNFIIFIAALVRYKRLNLTLLIANLAI 106
D + ++ +S ++ +A I+L+ IGH + I +++K +R +TN IANLA+
Sbjct: 38 DSEPELIDSTKLIEVOMVILAYCSILLGVIGNSLVHVVIKFSKRTVTNFFIANLAV 97

Query: 107 SDFLVAIVCCPFENDYVYVQLSWEHGMVLCSTVNYLRTVSVYSTKALLATAIDRYLAI 166
+D LV +C PF +Y ++ + W+ G VLC VY + + + + VST L IA+DR+ I
Sbjct: 98 ADLLVNTLCLPFTLTTLNGE-WQKGPVLCPLVYAGGLAVONSTITLTVIALDRHRCI 155

Query: 167 VMLPRPMKQATATGLIALVNTVSIATPSAYFTTETVLYIVKSGENIFGQIWPVDOQ 226
V+ L ++ Q + +L W VS L+A P A F ++ +I+ E +C +W + + +
Sbjct: 156 VYHLESKISQISFLITGLANGVSALLASPLAIFREYSLIEIIPDFEIVACTENKPGEEK 215

Query: 227 -LYKSYFLIFGIEFVGPVWMTLCYARISRELWFKWPGFQTEGIRKLRCAKXTVLY 285
+Y Y L L +V P+ ++ Y RI +L PG + +R R+K +
Sbjct: 218 GIYGTIYLSLLILYVPLGLIISFYTRISKLKHHVSPGAHWHYHQR-RKNTKM 272

Query: 286 LMCILTAYVLCWAPPFYGTTFVDFDFFVYKEXHYLTAFYIVECIAMSNMINTLCFVTV 345
L+C+ + +W P +F + D V + KY F + IAM ++ RL + +
Sbjct: 273 LVCVVVFAVSWLPLHAFGLAVDIDSHV-LDLKELIFTVFHIIAMCSTFAHPLYGM 331

Query: 346 KNDTVKYF 353
++ K F
Sbjct: 332 NSNYRKAF 339

6

>sp|Q91178|GPRX_DRYLA PROBABLE G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR (FRAGMENT).
Length = 428

Score = 823 (289.7 bits), Expect = 9.8e-83, P = 9.8e-83
Identities = 182/422 (43%), Positives = 266/422 (63%)

Query: 2 ESSPIQSSGNSSTLGRVPTGPGSTASGVPEVL-RVASESVALLFMILLDLTAV 57
+SP+ S + S P P+ P+VG+ + + LF M+L+ A+
Sbjct: 5 KTSPIITSDHSISNFTGLFGPHTVP-PDGVYVTSQSQKDLFGCLFQNTLNLIAL 61

Query: 58 AGNAAMVIAKTPALRXFVFVFLCLVDLAAULTMPLAMSSALFDHALFGEVACRL 117
M VM IA+ P L+KF FY HLC VDH+ A+ LMP+ +SSS F +F +C+
Sbjct: 62 LANTGVMAIARAPHLKXFAFYHCLCAVDVLCATLMLPLGISSSPFFGTWFTILECOV 121

Query: 118 YLFLSVCFVSLAITSVAINVERYVYVHPHRYEVMTGLVASVLGVWVXKALMASVP 177
Y+FL+V + L+IL+ +AI+VERY+Y+VHPHRYEV+MT+ LV V++ +W R+L+ A V
Sbjct: 122 YIFLWFLMISLITITAIISVERYFYIHPHRYEVMTINLVGMILMIFKSLALLATV 181

Query: 178 VLGRVSEEGAPSVPPGCSLQNSHAYCOVYVFAVLYFLPLLILLVYCSNFRVAV 237
+G + + CSLSHS +F VAF V+ FL P+ +I YV + + +VAR
Sbjct: 182 LFGMPYVGHSSIAASHSLHASHSLRGVFAVLFCVIGLAPVWVIFSVYSAVYKARS 241

Query: 238 AAMQHP-LPTWME-TP-RQSESSSRSTWTSAGAPQT-TPHRTGGGAAYVLLAVG 293
AA+Q P +PTW + +P + RS+S+ +S+T+T+ PQ +P R F GGA+ + L +
Sbjct: 242 AALQVPAVPTWADAPKDRSDSINSQTIITRTLPQLSPERAFSGKAALTLAFIV 301

Query: 294 GDFLLCLPYFSRLYVALSAQPISTGQSVSVTVYGYFCFTSNPFYGLNRQIRELS 353
GDFLCLPLPFH L+L + S G +E V W+ Y F HP FYG LNRQIR EL
Sbjct: 302 GDFVCLPFFIFLHQLSLGSKSPGLDEAVNMLAYSSFAVNPFGYGLNRQIRELV 361

Query: 354 K-QFVCFKPAPEEELRPSREGSIEENFLOQFLOGCPSESVNSRPLSPKO-EPPAVD 411
K + C +P Et S EGS +ENFLO+Q T SE+ S +P+ E A
Sbjct: 362 KFRRCVTPV-EITGSPLEGSQENFLOQFLOGTSSSETHPSFANSRPMMEQA- 416

Query: 412 FRIPQIAEE 421
+IPSGI EE
Sbjct: 417 HKIPQIPEE 426

図 7

>sp|P23749|RTA_RAT PROBABLE G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR RTA.
Length = 343

Score = 461 (162.3 bits), Expect = 2.3e-44, P = 2.3e-44
Identities = 121/323 (37%), Positives = 178/323 (55%)

Query: 2 MDTLNSSGTVESALMYSRGS-TYMT-AYL---VLSLAMFTCLQMGNSHWIWLGR 55
HQ G E+ YSRG T+ A L V++ + CLOG+ GN +VW GF
Sbjct: 13 HQMHPGMSSEALELYSRGFLTIEQIATLPPAVNTYIFLLCLGLVGNGLVWFFGS 72

Query: 56 MHRNPFCEIYLHLAAADLLFESMASTLSLETQPLVMT-TDKVHELMKRLMYFAYTVGLS 114
+ R PF IY L+LAAD +LFS A L ++ D V ++ + + G+S
Sbjct: 73 IKRTPFSIYFLHLASADGIYLSKAVIALINMGTFSGPDYVRVRSIVGLCTFFAGVS 132

Query: 115 LLTAISTQRCLSVLPFIFKCHRPRLHSAVCGLLVTLCLMNGLTSSFCSEFL-KFNE 172
LL AIS +RC+SV+FP+M+ RP+ LSA VC LLW L L+ + + FC FL + +
Sbjct: 133 LIPAISIERCVSIFPMYWRPRKRLSAGVCALLMLLSFLVTSIHNYFCH-FLGHEASG 191

Query: 173 DRCFYDMQALINGVLTVMTLSSLTFLVMYRRSSQNRORTRLFVVLASVLFVLI 232
C +D+ L+ + P+M L L L + V +++ R++ +L VVLA V VFL+
Sbjct: 192 TACLNDITSLGILFFLFCPLMLPCLALILHVEQRAR-RORSALNHYVLAIVSVFLV 250

Query: 233 CSLPLSIYMFVLYM-SLPPKQVLCFSLRSLSSVSANPYIYVYSSRRSHLPTRS 291
S+ L I M L+M+ +P ++ L +SSA P+YFL G +S RL
Sbjct: 251 SSIYLGIDWF-LFWFQIPAPPEY---YDLCICINSSAKPIYVFLAGRDSORL-MEP 305

Query: 292 LGTVLQALRE-EPELEGGETPTVTGNDM 319
L V QALR+ EP TP T EM
Sbjct: 306 LRVYFQALRDGAEPDASSTPNVTYTHM 335

図 9

>sp|Q02824|A1AA_RABIT ALPHA-1A ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA 1A-ADRENERGIC RECEPTOR).
Length = 466

Score = 295 (103.8 bits), Expect = 1.0e-31, Sum P(2) = 1.0e-31
Identities = 66/215 (30%), Positives = 113/215 (52%)

Query: 8 STRESNHSHTCMPLSKMPSLHGIIRSTVLVFLAASFVGNIVLALVLRKPOLQVTH 67
S S+SS+ P+ P+P++ I+ +L + +GNI++ L+ L VT+
Sbjct: 5 SGNASDSSNCHTPPA-PVNIKATLLGVLGLILFGLGNIILVLSVACHRLHSVTH 62

Query: 68 RFIENLIVDQLQISLVAPWVATSVPLFPLNSHFCTALVSLTHLFAFASVNTIVVSV 127
+I ML V DLL S V P+ + +M FC ++ L AS+ ++ V+S+
Sbjct: 63 YIIVNLAVADLLLTSTVLPFAIFEILGYMAFRGVFNIMAAVDVLOCTASIIISLCVISI 122

Query: 128 DRYLSIIHPLSYPSKMTORRGVLLYGTWIVAILQSTPPLYGNGQAFDERNALCSHWG 187
DRY+ + +PL YP+ +TORRG L W +++ S PL+GM Q A D+ +C +
Sbjct: 123 DRYIGVSYPLRYPTIIVTORRGLALLCVMAFLSVISVPLFGMRQAPDDET-ICQI-N 179

Query: 188 ASPSYTILSYVSFIVIPLIWIACTSVVFCARRQ 222
P Y + S + +PL ++A Y V+ A+R+
Sbjct: 180 EEPGYVLSALGSFYVPLTIILAMYCRVYVAKRE 214

Score = 106 (37.3 bits), Expect = 1.0e-31, Sum P(2) = 1.0e-31
Identities = 23/75 (30%), Positives = 41/75 (54%)

Query: 396 KAAKVIIFIIISYVLSGPGYCLAVLAVMDVETQVPMVITIIIMFLQCCIPYVYG 455
KAAK + I++ +VL P+ + + + + + P + V I+ ML +L CI+P +Y
Sbjct: 269 KAAKTLGIYVCGVLCWLPFLVWPIGSGFP-DFKPPETVFKIVFNLGYNLSINPIIYP 327

Query: 458 YMKTKIKKIQDKLK 470
+ KK Q+LK
Sbjct: 328 CSSQEFKAFQVULK 342

図 8

>sp|Q98907|P2Y3_CHICK P2Y PURINOCEPTOR 3 (P2Y3) (NUCLEOSIDE DIPHOSPHATE RECEPTOR).
Length = 328

Score = 452 (159.1 bits), Expect = 2.0e-43, P = 2.0e-43
Identities = 85/185 (45%), Positives = 116/185 (62%)

Query: 15 CDFSEKQVQLSLAYSIIIFLGLPLNGTVLWHFSGQTKRNSCATTYLVNLMADLLVYL 74
C F E++KQV L L YS++F+GLPLN V+ W K + T Y++NL +ADLLV
Sbjct: 13 CTFREEFKQVLLPLYVSFVLLGLPLNAVVGQIMARKALTRTTIYMLNLMADLLVYC 72

Query: 75 -LPFLIITYSLDRMPFGLLCKLHFLFYINLYGSILLTLCISVHQFLGVCHPLCSLPY 133
LP LI Y+ D MPFG+ CK V F FY NL+GSIL LTCISV ++G+CHPL S
Sbjct: 73 SLPLIITYTQKDYMPFGDTCFVRFGFYTLNHSILFLTCISVQRYNGICHPLASMK 132

Query: 134 RT-RRHAMLGTSTTVALVQLPTAFSHDITYNGHLYDMYDQENFDRLFAYGIVLT 192
+ ++ ML + W +V+ Q IPT F+ T + + YD++ + F YGI LT
Sbjct: 133 KKGKLLTWLCAAWFIVIAQCLPTFFVFASTGTQRNRTVCYDLPSPDRSTSYFFYGITLT 192

Query: 193 LSGFL 197
+HGFL
Sbjct: 193 ITGFL 197

図 10

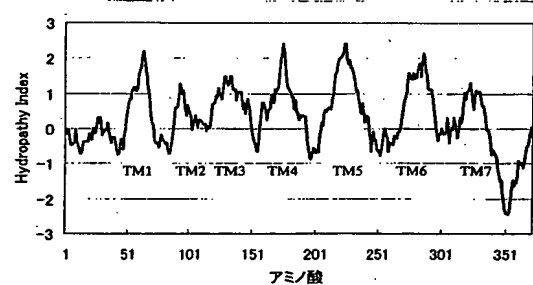


図 15

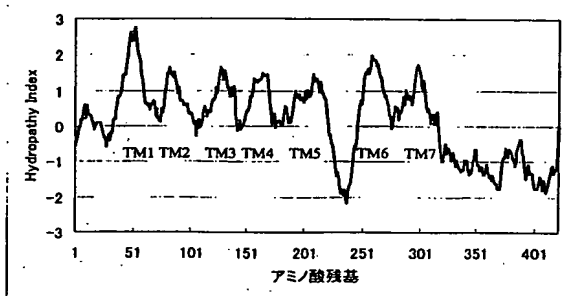


図 16

```
*****
TM1 *****
1 MLAAAFADSN SSSMNVSAH LHFAGGYLPS DSQWRTIIP ALLVAVCLVG FVGNLCVIGI 60
*****
TM2 *****
61 LLHNAWKGP SWHSLILNL SLADLSLLF SAPIRATAYS KSVWDLGWFV CKSSDWFIHT 120
*****
TM3 *****
121 CMAAKSLTIV VYAKVCFMYA SDPAKQVSIH NYTIWSVLVA IWTVASLPL PENFFSTIRH 180
*****
TM4 *****
181 HEGVEMCLVD VPAVAEEFMS MFGKLYPLLA FGLPLFFASF YFWRAYDQCK KRGTQNLRL 240
*****
TM5 *****
241 NQIRSKQVTV MLLSIAIISA VLWLPENVAW LNVHLKAAG PAPPQGFIAL SQVLMFSSIS 300
*****
TM6 *****
301 ANPLIFLWMS EEFREGLKV WKNWITKPP TYSESQETPA CNSEGLPKV PSPSPASIP 360
*****
TM7 *****
361 EKEKPSPPSS GKQTERAEI PILPVEQFW HERDTPSVQ DNDPIWEHE DQETCEGVK 419
```

図 17

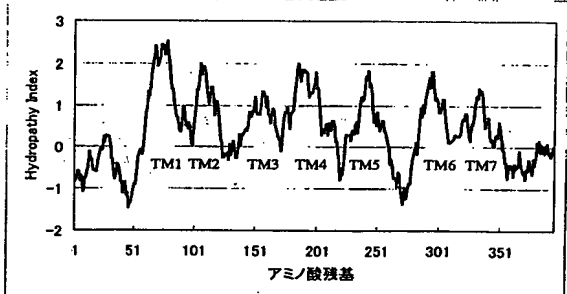


図 18

```
NETTNGFNDNATNTSTSLFVNLPHCAHA-TSFPFH
AL121755
AF236082
U42766
U76254
U42389
U50144
D86238
M81490
AF037444

FYSYDYMPL DEEDVYNSR TFFAAKIVIGIALAGILVCCI GNFVF
FYCYDYMPL DEEDVYNSR TFFAAKIVIGIALAGILVCCI GNFVF
QTTPRGELVP DPEPELIDST KLEIVQVVLILAYCSII LCGVIGNSLV
QTTPRGELVP DPEPELIDST KLEIVQVVLILAYCSII LCGVIGNSLV
HTTLPGLAP DPEPELIDST KLEIVQVVLILAYCSII LCGVIGNSLV
HTTLPGLAP DPEPELIDST KLEIVQVVLILAYCSII LCGVIGNSLV
FETYNITVNDGFCDDYDOLLSEDM SSATFKIIVYLYPIFI FALIGNGTV
LKLTDLVTFNASEPDPESGSDTGCHAAI SEGPYAKYI I VLYVYL I LVAVGCHLLF

***** TM1 *****
FYSYDYMPL DEEDVYNSR TFFAAKIVIGIALAGILVCCI GNFVF
FYCYDYMPL DEEDVYNSR TFFAAKIVIGIALAGILVCCI GNFVF
QTTPRGELVP DPEPELIDST KLEIVQVVLILAYCSII LCGVIGNSLV
QTTPRGELVP DPEPELIDST KLEIVQVVLILAYCSII LCGVIGNSLV
HTTLPGLAP DPEPELIDST KLEIVQVVLILAYCSII LCGVIGNSLV
HTTLPGLAP DPEPELIDST KLEIVQVVLILAYCSII LCGVIGNSLV
FETYNITVNDGFCDDYDOLLSEDM SSATFKIIVYLYPIFI FALIGNGTV
LKLTDLVTFNASEPDPESGSDTGCHAAI SEGPYAKYI I VLYVYL I LVAVGCHLLF

***** TM2 *****
FYSYDYMPL DEEDVYNSR TFFAAKIVIGIALAGILVCCI GNFVF
FYCYDYMPL DEEDVYNSR TFFAAKIVIGIALAGILVCCI GNFVF
QTTPRGELVP DPEPELIDST KLEIVQVVLILAYCSII LCGVIGNSLV
QTTPRGELVP DPEPELIDST KLEIVQVVLILAYCSII LCGVIGNSLV
HTTLPGLAP DPEPELIDST KLEIVQVVLILAYCSII LCGVIGNSLV
HTTLPGLAP DPEPELIDST KLEIVQVVLILAYCSII LCGVIGNSLV
FETYNITVNDGFCDDYDOLLSEDM SSATFKIIVYLYPIFI FALIGNGTV
LKLTDLVTFNASEPDPESGSDTGCHAAI SEGPYAKYI I VLYVYL I LVAVGCHLLF

***** TM3 *****
FYSYDYMPL DEEDVYNSR TFFAAKIVIGIALAGILVCCI GNFVF
FYCYDYMPL DEEDVYNSR TFFAAKIVIGIALAGILVCCI GNFVF
QTTPRGELVP DPEPELIDST KLEIVQVVLILAYCSII LCGVIGNSLV
QTTPRGELVP DPEPELIDST KLEIVQVVLILAYCSII LCGVIGNSLV
HTTLPGLAP DPEPELIDST KLEIVQVVLILAYCSII LCGVIGNSLV
HTTLPGLAP DPEPELIDST KLEIVQVVLILAYCSII LCGVIGNSLV
FETYNITVNDGFCDDYDOLLSEDM SSATFKIIVYLYPIFI FALIGNGTV
LKLTDLVTFNASEPDPESGSDTGCHAAI SEGPYAKYI I VLYVYL I LVAVGCHLLF

***** TM4 *****
FYSYDYMPL DEEDVYNSR TFFAAKIVIGIALAGILVCCI GNFVF
FYCYDYMPL DEEDVYNSR TFFAAKIVIGIALAGILVCCI GNFVF
QTTPRGELVP DPEPELIDST KLEIVQVVLILAYCSII LCGVIGNSLV
QTTPRGELVP DPEPELIDST KLEIVQVVLILAYCSII LCGVIGNSLV
HTTLPGLAP DPEPELIDST KLEIVQVVLILAYCSII LCGVIGNSLV
HTTLPGLAP DPEPELIDST KLEIVQVVLILAYCSII LCGVIGNSLV
FETYNITVNDGFCDDYDOLLSEDM SSATFKIIVYLYPIFI FALIGNGTV
LKLTDLVTFNASEPDPESGSDTGCHAAI SEGPYAKYI I VLYVYL I LVAVGCHLLF
```

図 19

GPRv21	TVLVIVKSO—EKIFCGQIWPVDDQ—LYKSYFLIFGIEFVGPVVTITLCYARISRELW
AL121755	TVLVIVKSO—EKIFCGQIWPVDDQ—LYKSYFLIFGIEFVGPVVTITLCYARISRELW
AF236082	TVLVIVKSO—EKIFCGQIWPVDDQ—LYKSYFLIFGIEFVGPVVTITLCYARISRELW
U42766	SLIEIIPDF—EIVACTEKWPCEKSIYGTIVTSLSSLLILYVPLGIISFSYTRINSKLG
U76254	SLIEIIPDF—EIVACTEKWPCEKSIYGTIVTSLSSLLILYVPLGIISFSYTRINSKLG
U42389	SLIEIIPDF—EIVACTEKWPCEKSIYGTIVTSLSSLLILYVPLGIISFSYTRINSKLG
U50144	SLIEIIPDF—EIVACTEKWPCEKSIYGTIVTSLSSLLILYVPLGIISFSYTRINSKLG
D86238	SLIEIIPDF—EIVACTEKWPCEKSIYGTIVTSLSSLLILYVPLGIISFSYTRINSKLG
M81490	DIPMSPIHTKCEKIIICREKWPSSQ—EYVITSLFALQFVPLCYLITFYARITIRVW
AF037444	TKQSNSTGL—CLEHFENDH—RYIYSIVHRLQFVPLVITVINTHIGYIVW
***** TMS *****	
GPRv21	FKAVPG—FQTEQIRKRLCRRTVTLVLMCILTATVLCWAPFYGTIVRDFPTVFKKX
AL121755	FKAVPG—FQTEQIRKRLCRRTVTLVLMCILTATVLCWAPFYGTIVRDFPTVFKKX
AF236082	FKAVPG—FQTEQIRKRLCRRTVTLVLMCILTATVLCWAPFYGTIVRDFPTVFKKX
U42766	NHVSFG—AANDHTQR—RQKTKMLVCYVVFVAVSWPLHAFQLAVD—IDSRVLDLKE
U76254	NHVSFG—AANDHTQR—RQKTKMLVCYVVFVAVSWPLHAFQLAVD—IDSRVLDLKE
U42389	NHVSFG—AANDHTQR—RQKTKMLVCYVVFVAVSWPLHAFQLAVD—IDSRVLDLKE
U50144	NHVSFG—AANDHTQR—RQKTKMLVCYVVFVAVSWPLHAFQLAVD—IDSRVLDLKE
D86238	NHVSFG—AANDHTQR—RQKTKMLVCYVVFVAVSWPLHAFQLAVD—IDSRVLDLKE
M81490	AKRPPGEAETHDRQMARSKRMVKNLTVIIVFTCCILPFHILQLLLN—DEEFARNDP
AF037444	IKKTPGEAETHDRQMARSKRMVKNLTVIIVFTCCILPFHILQLLLN—DEEFARNDP
***** TM7 *****	
GPRv21	YLTAFYIVGCIAMNSHINTLCFVTVKNDTVYFKKIML—LHWKASYNGGKS
AL121755	YLTAFYIVGCIAMNSHINTLCFVTVKNDTVYFKKIML—LHWKASYNGGKS
AF236082	YLTAFYIVGCIAMNSHINTLCFVTVKNDTVYFKKIML—LHWKASYNGGKS
U42766	YKLIIFTVFHIIAMCSTFARPLLYGWNHNYRKAFLSAFR—CEQRDLAIHSEV
U76254	YKLIIFTVFHIIAMCSTFARPLLYGWNHNYRKAFLSAFR—CEQRDLAIHSEV
U42389	YKLIIFTVFHIIAMCSTFARPLLYGWNHNYRKAFLSAFR—CEQRDLAIHSEV
U50144	YKLIIFTVFHIIAMCSTFARPLLYGWNHNYRKAFLSAFR—CEQRDLAIHSEV
D86238	YKLIIFTVFHIIAMCSTFARPLLYGWNHNYRKAFLSAFR—CEQRDLAIHSEV
M81490	LPYVVFAPHLAMSHCCYRPIIYCYNARFSGFVQLMHRPCLRRWCLLSVGDGMKAT
AF037444	MDYVBLCAQWLSHSCYNPFVYFSLSATFRRLRMTACRLKQKR—LRQHLNRRSRA
***** TM1 *****	
GPRv21	S—ADLDLTKICM—PATEEVDICRLK
AL121755	S—ADLDLTKICM—PATEEVDICRLK
AF236082	S—ADLDLTKICM—PATEEVDICRLK
U42766	SVTFKAK—KNLEVRKNSG—PHDSFTEATNV
U76254	SVTFKAK—KNLEVRKNSG—PHDSFTEATNV
U42389	SVTFKAK—KNLEVRKNSG—PHDSFTEATNV
U50144	SVTFKAK—KNLEVRKNSG—PHDSFTEATNV
D86238	SVTFKAK—KNLEVRKNSG—PHDSFTEATNV
M81490	SGTGAPLPLN—RMTSTTYISARRKPRATSLRANPLSCGETSPLR
AF037444	DARDORTVYGSAESIPSKYSAGLSHSHGAKHYNTSSGEWQCLKEKKLKGVSNDHYL

図 21

1	MEDLFSPSIL PPAPNISVPI LLGWLNLTL GQCAPASGPP SRRVRLVFLG VILVAVAGN 60
***** TM1 *****	
61	TTVLCRLCGG GGPWAGPKRR KNDLLVQLA LADLYACGGT ALSQLAMELL GEPRATGDL 120
***** TM2 *****	
121	ACRFLQLQA SGRGASHLV VLIALERRA VRLPHGRPLP ARALALGWL LALLIALPPA 180
***** TM3 *****	
181	FVVRGDSPP LPPPPPTSL QGAPPAARA WPGQRRCCHI FAPLPRHLQ VYAFYAVAG 240
***** TM4 *****	
241	FVAPVTVLGV ACGHLLSVW RHRPQAPAAA APWSASPGRA PAPSALPRAK VQSLKMSLLL 300
***** TM5 *****	
301	ALLFYGCELP YFAARLAAAN SSGPAGDWEG EGLSAALRVV AMANSALNPF VYLFFQAGDC 360
***** TM6 *****	
361	RLRRQLRKL GSLCCAPQGG AEDEEGPRGH QALYRQRWPH PHTHARREP LDEGLRPPP 420
***** TM7 *****	
421	PRRPLPCSC ESAF

図 20

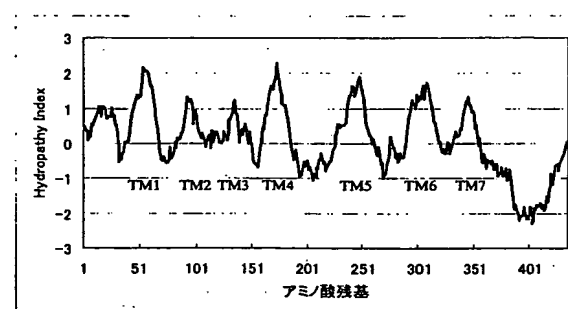


図 22

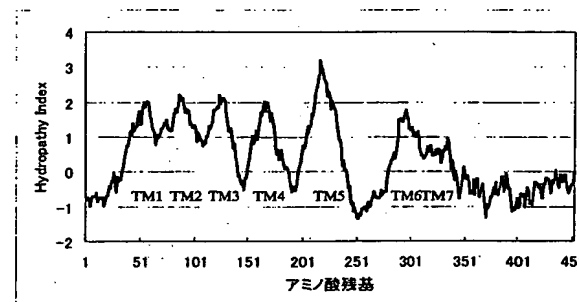


图 2-3

[illegible]

25

```

HSH2R_1
D49783      QEEKPLKLQVWSGTEVT
H32701      QEEKPLKLQVWSGETVTAPOGATDR
U25440      QEEKPLKLQVWSGETVTAPOGATDR
S57565      QEEKPLKLQVWSGETLTHQCPPIR
S73473      QNS-PLNR-FDGYCEGR-FPT
W74716      QNS-PLNR-FDGYCEGR-FPT
U64032      SAGAALPLAALALTAAPASSAAAPGQAACAGRRKPPCAFRWRLGLPLRPPTQLRAK
L41147      QQVYPLPLPPDSDSDSDSAGSGSSQLRLTAQLLLPGEATQDPPILPTRAAAAYWFFNIIDPA
GPRv47      LQGTGCPSESWSRPLSPKQEPYAVDFIRPGQIAEETSEFLEQLTSDIIMSDSYLRA
D43633      IQRTSSSETMSPFANSNP-RNNEQAHKIPGQIPEEQA

HSH2R_1
D49783
H32701
U25440
S57565
S73473
W74716
U64032      YSSLSHKIRAGGAQRAEACALRSEVAALSVARDVAEDNTCQAYELADYRNLRETDI
L41147      EPELRPHMPLPIH
GPRv47      ASPRIE
D43633

```

24

[illegible]

图 26

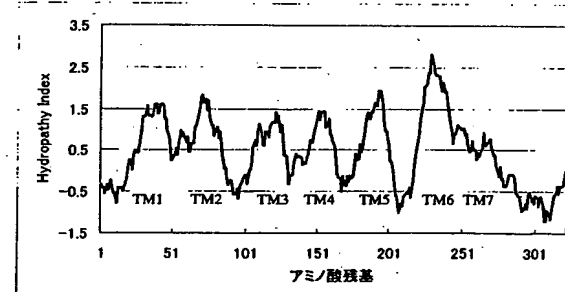


图 27

[illegible]

图 29

[illegible]

图 28

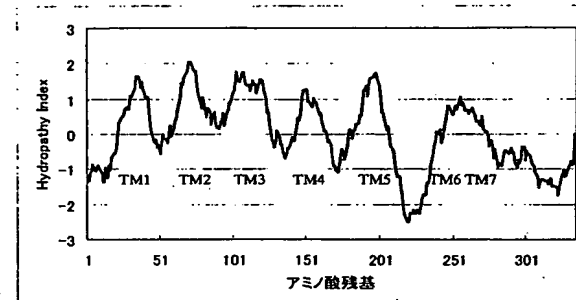


图 30

Y14705
AJ277752
AF031897
X99953
AF069555
X98283
D63665
GPRv71

YKVT RPLASANSCLDPVLYFTGDKYRNLQQLCRGSK - PKRR - TAASS
YKVT RPLASANSCLDPVLYFTGDKYRNLQQLCRGST - PKRR - TAASS
YK ITRPLASINSCLDPILYFMAGDKYRGLRRGAQR - P-R - PVPST
YKVT RPLASANSCLDPILYFLANDRYRRL IRTYRRSSVPHRRCMTRPQTQPHMTAG
YKCT RPFASMNSVLDPILYFYFTQQRKFRESTRYLLDKMS - SKWRH
X98283 YKCT RPFASMNSVLDPILYFYFTQQRKFRESTRYLLDKMS - SKWRH
D63665 YKCT RPFASMNSVLDPILYFYFTQQRKFRESTRYLLDKMS - SKWRH
GPRv71 DMEASGEQLPQSPVLSFGKGNRYRLLQKLQRXKLG - EHPAGR

.. : :

Y14705
AJ277752
AF031897
X99953
AF069555
X98283
D63665
GPRv71

ALVTJHEESISRWDTHQDSTFSAYEGDRL
ALVTJHEESISRWDIHQDSIFPAYEGDRL
LALVSPYDSSVYVSGCENSE - SRMGTVWSRGCG
PLPVI SAEI PSNGSMYRDENGEGCSREHRVETDTKEINQMMNRSTIKRNS TKDNMK
HCITYGS
X98283 HCISTGS
D63665 RV
GPRv71 RCPCLNRSG

Y14705
AJ277752
AF031897
X99953
AF069555
X98283
D63665
GPRv71

NRHGENYLPYVEVEKEDYETKRENKRTTEQSSKTNAEQDELQTQIDSLKRGKWLJSK

Y14705
AJ277752
AF031897
X99953
AF069555
X98283
D63665
GPRv71

KGAAGEMEGKMGMEFPEGEGSTWHLTKPMYGGKDLAKNVEEYGYGKELQNFPKA

1/66

SEQUENCE LISTING

<110> HELIX RESEARCH INSTITUTE

<120> Novel G protein-coupled receptors and genes encoding them,
and their production and use.

<130> H1-113DP1PCT

<140>

<141>

<150> JP 1999-375152

<151> 1999-12-28

<150> JP 2000-101339

<151> 2000-03-31

<160> 63

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 371

<212> PRT

3/66

Val Val Leu Leu Tyr Ala Ser Thr Tyr Val Leu Val Ser Leu Ser Ile
130 135 140Asp Arg Tyr His Ala Ile Val Tyr Pro Met Lys Phe Leu Gln Gly Glu
145 150 155 160Lys Gln Ala Arg Val Leu Ile Val Ile Ala Trp Ser Leu Ser Phe Leu
165 170 175Phe Ser Ile Pro Thr Leu Ile Ile Phe Gly Lys Arg Thr Leu Ser Asn
180 185 190Gly Glu Val Gln Cys Trp Ala Leu Trp Pro Asp Asp Ser Tyr Trp Thr
195 200 205Pro Tyr Met Thr Ile Val Ala Phe Leu Val Tyr Phe Ile Pro Leu Thr
210 215 220Ile Ile Ser Ile Met Tyr Gly Ile Val Ile Arg Thr Ile Trp Ile Lys
225 230 235 240Ser Lys Thr Tyr Glu Thr Val Ile Ser Asn Cys Ser Asp Gly Lys Leu
245 250 255

Cys Ser Ser Tyr Asn Arg Gly Leu Ile Ser Lys Ala Lys Ile Lys Ala

2/66

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Pro Ala Asn Phe Thr Glu Gly Ser Phe Asp Ser Ser Gly Thr Gly
1 5 10 15Gln Thr Leu Asp Ser Ser Pro Val Ala Cys Thr Glu Thr Val Thr Phe
20 25 30Thr Glu Val Val Glu Gly Lys Glu Trp Gly Ser Phe Tyr Tyr Ser Phe
35 40 45Lys Thr Glu Gln Leu Ile Thr Leu Trp Val Leu Phe Val Phe Thr Ile
50 55 60Val Gly Asn Ser Val Val Leu Phe Ser Thr Trp Arg Arg Lys Lys Lys
65 70 75 80Ser Arg Met Thr Phe Phe Val Thr Gln Leu Ala Ile Thr Asp Ser Phe
85 90 95Thr Gly Leu Val Asn Ile Leu Thr Asp Ile Asn Trp Arg Phe Thr Gly
100 105 110Asp Phe Thr Ala Pro Asp Leu Val Cys Arg Val Val Arg Tyr Leu Gln
115 120 125

4/66

260 265 270

Ile Lys Tyr Ser Ile Ile Ile Ile Leu Ala Phe Ile Cys Cys Trp Ser
275 280 285Pro Tyr Phe Leu Phe Asp Ile Leu Asp Asn Phe Asn Leu Leu Pro Asp
290 295 300Thr Gln Glu Arg Phe Tyr Ala Ser Val Ile Ile Gln Asn Leu Pro Ala
305 310 315 320Leu Asn Ser Ala Ile Asn Pro Leu Ile Tyr Cys Val Phe Ser Ser Ser
325 330 335Ile Ser Phe Pro Cys Arg Glu Gln Arg Ser Gln Asp Ser Arg Met Thr
340 345 350Phe Arg Glu Arg Thr Glu Arg His Glu Met Gln Ile Leu Ser Lys Pro
355 360 365Glu Phe Ile
370

<210> 2

<211> 363

5/66

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Gly Pro Gly Glu Ala Leu Leu Ala Gly Leu Leu Val Met Val Leu

1 5 10 15

Ala Val Ala Leu Leu Ser Asn Ala Leu Val Leu Leu Cys Cys Ala Tyr

20 25 30

Ser Ala Glu Leu Arg Thr Arg Ala Ser Gly Val Leu Leu Val Asn Leu

35 40 45

Ser Leu Gly His Leu Leu Leu Ala Ala Leu Asp Met Pro Phe Thr Leu

50 55 60

Leu Gly Val Met Arg Gly Arg Thr Pro Ser Ala Pro Gly Ala Cys Gln

65 70 75 80

Val Ile Gly Phe Leu Asp Thr Phe Leu Ala Ser Asn Ala Ala Leu Ser

85 90 95

Val Ala Ala Leu Ser Ala Asp Gln Trp Leu Ala Val Gly Phe Pro Leu

100 105 110

Arg Tyr Ala Gly Arg Leu Arg Pro Arg Tyr Ala Gly Leu Leu Gly

7/66

Tyr Val Met Thr Arg Leu Ala Glu Leu Val Pro Phe Val Thr Val Asn

260 265 270

Ala Gln Trp Gly Ile Leu Ser Lys Cys Leu Thr Tyr Ser Lys Ala Val

275 280 285

Ala Asp Pro Phe Thr Tyr Ser Leu Leu Arg Arg Pro Phe Arg Gln Val

290 295 300

Leu Ala Gly Met Val His Arg Leu Leu Lys Arg Thr Pro Arg Pro Ala

305 310 315 320

Ser Thr His Asp Ser Ser Leu Asp Val Ala Gly Met Val His Gln Leu

325 330 335

Leu Lys Arg Thr Pro Arg Pro Ala Ser Thr His Asn Gly Ser Val Asp

340 345 350

Thr Glu Asn Asp Ser Cys Leu Gln Gln Thr His

355 360

<210> 3

<211> 419

<212> PRT

<213> Homo sapiens

6/66

115

120

125

Cys Ala Trp Gly Gln Ser Leu Ala Phe Ser Gly Ala Ala Leu Gly Cys

130 135 140

Ser Trp Leu Gly Tyr Ser Ser Ala Phe Ala Ser Cys Ser Leu Arg Leu

145 150 155 160

Pro Pro Glu Pro Glu Arg Pro Arg Phe Ala Ala Phe Thr Ala Thr Leu

165 170 175

His Ala Val Gly Phe Val Leu Pro Leu Ala Val Leu Cys Leu Thr Ser

180 185 190

Leu Gln Val His Arg Val Ala Arg Arg His Cys Gln Arg Met Asp Thr

195 200 205

Val Thr Met Lys Ala Leu Ala Leu Leu Ala Asp Leu His Pro Ser Val

210 215 220

Arg Gln Arg Cys Leu Ile Gln Gln Lys Arg Arg Arg His Arg Ala Thr

225 230 235 240

Arg Lys Ile Gly Ile Ala Ile Ala Thr Phe Leu Ile Cys Phe Ala Pro

245 250 255

8/66

<400> 3

Met Leu Ala Ala Ala Phe Ala Asp Ser Asn Ser Ser Ser Met Asn Val

1 5 10 15

Ser Phe Ala His Leu His Phe Ala Gly Gly Tyr Leu Pro Ser Asp Ser

20 25 30

Gln Asp Trp Arg Thr Ile Ile Pro Ala Leu Leu Val Ala Val Cys Leu

35 40 45

Val Gly Phe Val Gly Asn Leu Cys Val Ile Gly Ile Leu Leu His Asn

50 55 60

Ala Trp Lys Gly Lys Pro Ser Met Ile His Ser Leu Ile Leu Asn Leu

65 70 75 80

Ser Leu Ala Asp Leu Ser Leu Leu Phe Ser Ala Pro Ile Arg Ala

85 90 95

Thr Ala Tyr Ser Lys Ser Val Trp Asp Leu Gly Trp Phe Val Cys Lys

100 105 110

Ser Ser Asp Trp Phe Ile His Thr Cys Met Ala Ala Lys Ser Leu Thr

115 120 125

9/66

Ile Val Val Val Ala Lys Val Cys Phe Met Tyr Ala Ser Asp Pro Ala
130 135 140

Lys Gln Val Ser Ile His Asn Tyr Thr Ile Trp Ser Val Leu Val Ala
145 150 155 160

Ile Trp Thr Val Ala Ser Leu Leu Pro Leu Pro Glu Trp Phe Phe Ser
165 170 175

Thr Ile Arg His His Glu Gly Val Glu Met Cys Leu Val Asp Val Pro
180 185 190

Ala Val Ala Glu Glu Phe Met Ser Met Phe Gly Lys Leu Tyr Pro Leu
195 200 205

Leu Ala Phe Gly Leu Pro Leu Phe Phe Ala Ser Phe Tyr Phe Trp Arg
210 215 220

Ala Tyr Asp Gln Cys Lys Lys Arg Gly Thr Lys Thr Gln Asn Leu Arg
225 230 235 240

Asn Gln Ile Arg Ser Lys Gln Val Thr Val Met Leu Leu Ser Ile Ala
245 250 255

Ile Ile Ser Ala Val Leu Trp Leu Pro Glu Trp Val Ala Trp Leu Trp
260 265 270

11/66

405 410 415

Gly Val Lys

<210> 4
<211> 393
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4
Met Glu Thr Thr Met Gly Phe Met Asp Asp Asn Ala Thr Asn Thr Ser
1 5 10 15

Thr Ser Phe Leu Ser Val Leu Asn Pro His Gly Ala His Ala Thr Ser
20 25 30

Phe Pro Phe Asn Phe Ser Tyr Ser Asp Tyr Asp Met Pro Leu Asp Glu
35 40 45

Asp Glu Asp Val Thr Asn Ser Arg Thr Phe Phe Ala Ala Lys Ile Val
50 55 60

Ile Gly Met Ala Leu Val Gly Ile Met Leu Val Cys Gly Ile Gly Asn
65 70 75 80

10/66

Val Trp His Leu Lys Ala Ala Gly Pro Ala Pro Pro Gln Gly Phe Ile
275 280 285

Ala Leu Ser Gln Val Leu Met Phe Ser Ile Ser Ser Ala Asn Pro Leu
290 295 300

Ile Phe Leu Val Met Ser Glu Glu Phe Arg Glu Gly Leu Lys Gly Val
305 310 315 320

Trp Lys Trp Met Ile Thr Lys Lys Pro Pro Thr Val Ser Glu Ser Gln
325 330 335

Glu Thr Pro Ala Gly Asn Ser Glu Gly Leu Pro Asp Lys Val Pro Ser
340 345 350

Pro Glu Ser Pro Ala Ser Ile Pro Glu Lys Glu Lys Pro Ser Ser Pro
355 360 365

Ser Ser Gly Lys Gly Lys Thr Glu Lys Ala Glu Ile Pro Ile Leu Pro
370 375 380

Asp Val Glu Gln Phe Trp His Glu Arg Asp Thr Val Pro Ser Val Gln
385 390 395 400

Asp Asn Asp Pro Ile Pro Trp Glu His Glu Asp Gln Glu Thr Gly Glu

12/66

Phe Ile Phe Ile Ala Ala Leu Val Arg Tyr Lys Lys Leu Arg Asn Leu
85 90 95

Thr Asn Leu Leu Ile Ala Asn Leu Ala Ile Ser Asp Phe Leu Val Ala
100 105 110

Ile Val Cys Cys Pro Phe Glu Met Asp Tyr Tyr Val Val Arg Gln Leu
115 120 125

Ser Trp Glu His Gly His Val Leu Cys Thr Ser Val Asn Tyr Leu Arg
130 135 140

Thr Val Ser Leu Tyr Val Ser Thr Asn Ala Leu Leu Ala Ile Ala Ile
145 150 155 160

Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Pro Leu Arg Pro Arg Met Lys Cys
165 170 175

Gln Thr Ala Thr Gly Leu Ile Ala Leu Val Trp Thr Val Ser Ile Leu
180 185 190

Ile Ala Ile Pro Ser Ala Tyr Phe Thr Thr Glu Thr Val Leu Val Ile
195 200 205

Val Lys Ser Gln Glu Lys Ile Phe Cys Gly Gln Ile Trp Pro Val Asp

13/66

210 215 220
Gln Gln Leu Tyr Tyr Lys Ser Tyr Phe Leu Phe Ile Phe Gly Ile Glu
225 230 235 240
Phe Val Gly Pro Val Val Thr Met Thr Leu Cys Tyr Ala Arg Ile Ser
245 250 255
Arg Glu Leu Trp Phe Lys Ala Val Pro Gly Phe Gln Thr Glu Gln Ile
260 265 270
Arg Lys Arg Leu Arg Cys Arg Arg Lys Thr Val Leu Val Leu Met Cys
275 280 285
Ile Leu Thr Ala Tyr Val Leu Cys Trp Ala Pro Phe Tyr Gly Phe Thr
290 295 300
Ile Val Arg Asp Phe Phe Pro Thr Val Phe Val Lys Glu Lys His Tyr
305 310 315 320
Leu Thr Ala Phe Tyr Ile Val Glu Cys Ile Ala Met Ser Asn Ser Met
325 330 335
Ile Asn Thr Leu Cys Phe Val Thr Val Lys Asn Asp Thr Val Lys Tyr
340 345 350

15/66

tgccctgacg actccctactg gacccctaac atgaccatcg tggcttctc ggtgtacttc 660
atccctctga caatcatcag catcatgtat ggcatttga tccgaactat tiggattaaa 720
agcaaanctt acgaanactg gatttccaac tgcctcagtg ggaanctgtg cagcagctat 780
aaccgaggac tcatctcnaa ggcaaanatc aaggetatca agtatagcat catcatcatt 840
cttgccttca tctcgtgtg gactccatc ttcctgttg acatttga caatttcaac 900
ctcttccag acaccagga gctttctat gctcttga tcatcagaa cctgccagca 960
ttgaatagtg ccatcaacc cctcatctac tgtgtcttca gcagctccat ctctttccc 1020
tgcaaggcgc aagatcaca ggtttccaga atgacttcc gggagagaa tgaagagcat 1080
gagatcaga tttgttcaa gccagaaatc atctag 1116

<210> 6
<211> 1092
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 6

atgggcccgc gcaaggcgt gctggcggt cctctgtga tggacttgc cgtggcgctg 60
ctatcaacg cactgtgt gcttcttgc gctacagcg ctgagctcg cactcgagcc 120
tcaggcgctc tctgttga tctgtcttg ggcacctgc tcttggcgc gctggacatg 180
ccttcaacg tctctgtgt gctggcggc ggcacacgt cgcgcgcgc cgcctgcnaa 240
gtcatgtgt tcttggaac ctctctggc tccacgcgc cgttgcgtt ggcggcgctg 300
agcgcagacc agtctgtgc agtggcttc cacttgcgt agcgcggac cctgcagccg 360
cgtatgcgc gctctgtct ggcctgtgc tggggacgt cgttgcctt ctacggcgt 420
gacttgcgt gctgtgtct tggctacag agcgccttc cgtctgttc gctggcgctg 480
cgcgcgcgc ctgagcttc gccttgcga gcttccacg ccaagctcca tgcctgtggc 540

14/66

Phe Lys Lys Ile Met Leu Leu His Trp Lys Ala Ser Tyr Asn Gly Gly
355 360 365

Lys Ser Ser Ala Asp Leu Asp Leu Lys Thr Ile Gly Met Pro Ala Thr
370 375 380

Glu Glu Val Asp Cys Ile Arg Leu Lys
385 390

<210> 5
<211> 1116
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 5

atgccagcca acttcacaga gggcagcttc gattccagtg ggaacggca gacgtcgat 60
tcttcccag tgccttgcac tgaacagtg actttactg aagtggtga aggaaggaa 120
tgggttctc tctactact ctttaagat gacaaatga taactcttg ggtctcttt 180
gtttttacca ttgttggaa ctcctgttg ctttttcca catggaggag aagaagaag 240
tcaagaatga ccttcttgt gactcagtg gccatcacg attctttac aggactggc 300
aacatctga cagatattaa ttgcgattc actggagat tcaaggcacc tgacctggt 360
tgccagtg tgcctattt gcaggtgtg ctgctcagc cctctacta cgtctctgt 420
tccctacga tagacagata ccatgcacg gctacacca tgaatttct tcaaggagaa 480
aagcaagcca ggtctctat tctgacgac tggagcctgt ctttctgtt ctcatctcc 540
acctgatca tatttggaa gaggacactg tccaacggtg aagtcagtg ctgggcccgt 600

16/66

ttctgtctg cgttggcgt gcttgcctc actgcctcc aggtcacgc gttggcagc 600
agacactgc agcgcattga cactgtcac atgaagcgc tgcctgtct cgcgcagct 660
caccocagtg tgcgcagcg ctgcctcac cagcagaag ggcgcgcna cgcgcacac 720
aggaagattg gactgtctat tgcaccttc ctcatctgt ttgcocctga tctatgac 780
agcttgcgc agctctgct cttgtcac gtaacgccc agtgggcat cctcagaag 840
tgcttacct acagcaagc ggtggcgac cgttccagt actctctgt cgcgcgcgc 900
ttccgcag tcttggcgc catgttgc cgttctga agagaaccc gcgcgcagca 960
tccacccatg acagctctt ggaatgtgc ggcagtggt accagctgt gaagagaa 1020
cgcgcgcag cgtcaccca caagctctt gggacagc agaatgatt ctgctgag 1080
cagacacact ga 1092

<210> 7
<211> 1260
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 7

atctggcag ctgccttgc agacttca cccagcaga tgaatgtc cttgtctac 60
ctcaccttg cggaggatg cctgcctct gattccagc actgagaa cactatccg 120
gctctcttg tggctcttg cctgttgc tctgttga accctgtgt gattgcatc 180
ctcttcaaa atgttggaa aggaagcca tccatgatc actccctat tctaatctc 240
agcttggctg atcttctct cctgtcttt tctgcacta tccagctac ggcgtactc 300
aaagtgttt ggaatcagg ctgttctgc tgaactct ctgactgtt tatcacaca 360
tcatggcag ccaagacct gaaatgtt tgggttcca aagtatctt catgtatca 420
agtacccag ccaagcagt gattatcac aactacaca tctgtcagt gctgttggc 480

17/66

atcggacg tggtagct gtaacccg cggaggtt tcttagac catcagcat 540
 catgaagtg tgganagtg cctcgtggt gtaacgctg tggcgaaga gtttatgtg 600
 atgtttgta agctctacc actcttgca ttggccttc catlatttt tgcagcttt 660
 tattctgga gacttatga ccaatgtaa aaacgagga ctaagacta aaactttaga 720
 aaccagatc gctcaagca agtcacagtg atgtcgtga gcatgcat catcttct 780
 gtcttggtg tcccgagtg ggtagcttg ctgtgggtat ggccttgaa ggtgcagcg 840
 ccggccccc cacaaggtt catagccctg tctcaagct tgaatttt catcttca 900
 gcaactctc taattttt tgtatgtg gaagagttt ggaaggtt gaagagtgta 960
 tgganagta tgataccta aaacttcca actgtctag agtctcaga aacaccagct 1020
 ggcactcag aggtcttcc tgacaggtt ccacttcag aatcccagc atccataca 1080
 gaaaagaga aaccagctc tccctctct ggcgaaggga aaactgaga ggcagagtt 1140
 cccatcttc ctgacgtaga gcagtttgg catgagggg acacagccc ttctgtacg 1200
 gacatgacc ctatcccctg ggaactgaa gatacagaga caggggaagg tgttaaatg 1260

<210> 8

<211> 1182

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

atggagacca ccatgggtt catgatgac aatgcacca aaacttccc cagttctct 60
 tctgtctca accctatgg agccatgcc acttcttcc catcaactt cagctacagc 120
 gactatgata tgccttggg tgaagatgag gatgtacca attccaggac gttcttctg 180
 gccagatgg tcaatggat ggccttggt ggcactatgc tggctcgg catggnaac 240
 ttcatcttta tctgtctct ggtcgtctac aagaactgc gcaacttcc caactctc 300

19/66

<400> 9

atgccagcca atttcacaga gggcagct

28

<210> 10

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
 synthesized primer sequence

<400> 10

ctagatgaat tctggttgg acagaatc

28

<210> 11

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
 synthesized primer sequence

18/66

atgcccaacc tggccatctc tgaactctg gtggcaatg tctgtgccc ctttagatg 360
 gactactatg tggtagcca gctctctgg gacacggcc agtctctg cactctctc 420
 aactactcgc gactctctc tctctatgc tccaccagt cctgtctgc catgcccatt 480
 gacaggatc tggctattg ccatcctcg agaccagga tgaagtcca aacagccact 540
 ggcctgatg cttgtgtg gacgggtcc atctgatcg ccatccttc cgtctcttc 600
 accaccaga cgtctctct catgtcaag agccaggaa agatctctg cggccagatc 660
 tggcctgtg accagcagct ctactcaag tctacttcc tcttatctt tggcatagaa 720
 ttctggccc cgtgtctac catgacctg tctatgcca gcatctccg ggaacttgg 780
 ttcaaggcgg tccctgatt ccagacagag cagatccga agagctcgc ctgcgcagg 840
 aagacggtc tgggtctat gtcactctc accgctcag tctatgctg ggcgccctc 900
 tacgcttca ccatgtcgc cgaactctc cccacgtgt ttgtgagga gaacactac 960
 ctactgctt tctactctg cgaactcgc gccatgaga acacatgat caacactcg 1020
 tgcctcga cgtcaagaa cgaacacct aacttctca aaagatcat gttctccac 1080
 tggaggtct ctacatgg cgttaagtc agtcagacc tggactcaa gacatggg 1140
 atgctgcca cgaagaggt ggaactcgc agactaaat aa 1182

<210> 9

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
 synthesized primer sequence

20/66

<400> 11

atgggccccg gcaagcgtc gctggcg

28

<210> 12

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
 synthesized primer sequence

<400> 12

tcagtgtc tctcagcg aggaatca

28

<210> 13

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
 synthesized primer sequence

2 1 / 6 6

<400> 13

atgtctggcag ctgctcttgc agactctaac

30

<210> 14

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 14

ctatttaaca ccttccctg tctcttgatc

30

<210> 15

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

2 3 / 6 6

Ser Val Pro Ile Leu Leu Gly Trp Gly Leu Asn Leu Thr Leu Gly Gln

20

25

30

Gly Ala Pro Ala Ser Gly Pro Pro Ser Arg Arg Val Arg Leu Val Phe

35

40

45

Leu Gly Val Ile Leu Val Val Ala Val Ala Gly Asn Thr Thr Val Leu

50

55

60

Cys Arg Leu Cys Gly Gly Gly Gly Pro Trp Ala Gly Pro Lys Arg Arg

65

70

75

80

Lys Met Asp Phe Leu Leu Val Gln Leu Ala Leu Ala Asp Leu Tyr Ala

85

90

95

Cys Gly Gly Thr Ala Leu Ser Gln Leu Ala Trp Glu Leu Leu Gly Glu

100

105

110

Pro Arg Ala Ala Thr Gly Asp Leu Ala Cys Arg Phe Leu Gln Leu Leu

115

120

125

Gln Ala Ser Gly Arg Gly Ala Ser Ala His Leu Val Val Leu Ile Ala

130

135

140

Leu Glu Arg Arg Arg Ala Val Arg Leu Pro His Gly Arg Pro Leu Pro

145

150

155

160

2 2 / 6 6

<400> 15

atggagacca ccatgggggt catgatg

28

<210> 16

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 16

ttatttttagt ctgatgcagt ccacctcttc

30

<210> 17

<211> 434

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Met Glu Asp Leu Phe Ser Pro Ser Ile Leu Pro Pro Ala Pro Asn Ile

1

5

10

15

2 4 / 6 6

Ala Arg Ala Leu Ala Ala Leu Gly Trp Leu Leu Ala Leu Leu Ala

165

170

175

Leu Pro Pro Ala Phe Val Val Arg Gly Asp Ser Pro Ser Pro Leu Pro

180

185

190

Pro Pro Pro Pro Pro Thr Ser Leu Gln Pro Gly Ala Pro Pro Ala Ala

195

200

205

Arg Ala Trp Pro Gly Gln Arg Arg Cys His Gly Ile Phe Ala Pro Leu

210

215

220

Pro Arg Trp His Leu Gln Val Tyr Ala Phe Tyr Glu Ala Val Ala Gly

225

230

235

240

Phe Val Ala Pro Val Thr Val Leu Gly Val Ala Cys Gly His Leu Leu

245

250

255

Ser Val Trp Trp Arg His Arg Pro Gln Ala Pro Ala Ala Ala Ala Pro

260

265

270

Trp Ser Ala Ser Pro Gly Arg Ala Pro Ala Pro Ser Ala Leu Pro Arg

275

280

285

Ala Lys Val Gln Ser Leu Lys Met Ser Leu Leu Leu Ala Leu Leu Phe

25/66

290 295 300
Val Gly Cys Glu Leu Pro Tyr Phe Ala Ala Arg Leu Ala Ala Trp
305 310 315 320
Ser Ser Gly Pro Ala Gly Asp Trp Glu Gly Glu Gly Leu Ser Ala Ala
325 330 335
Leu Arg Val Val Ala Met Ala Asn Ser Ala Leu Asn Pro Phe Val Tyr
340 345 350
Leu Phe Phe Gln Ala Gly Asp Cys Arg Leu Arg Arg Gln Leu Arg Lys
355 360 365
Arg Leu Gly Ser Leu Cys Cys Ala Pro Gln Gly Gly Ala Glu Asp Glu
370 375 380
Glu Gly Pro Arg Gly His Gln Ala Leu Tyr Arg Gln Arg Trp Pro His
385 390 395 400
Pro His Tyr His His Ala Arg Arg Glu Pro Leu Asp Glu Gly Gly Leu
405 410 415
Arg Pro Pro Pro Pro Arg Pro Arg Pro Leu Pro Cys Ser Cys Glu Ser
420 425 430

27/66

85 90 95
Ala Met Leu Ser Ser Ser Ala Leu Phe Asp His Ala Leu Phe Gly Glu
100 105 110
Val Ala Cys Arg Leu Tyr Leu Phe Leu Ser Val Cys Phe Val Ser Leu
115 120 125
Ala Ile Leu Ser Val Ser Ala Ile Asn Val Glu Arg Tyr Tyr Tyr Val
130 135 140
Val His Pro Met Arg Tyr Glu Val Arg Met Thr Leu Gly Leu Val Ala
145 150 155 160
Ser Val Leu Val Gly Val Trp Val Lys Ala Leu Ala Met Ala Ser Val
165 170 175
Pro Val Leu Gly Arg Val Ser Trp Glu Gly Ala Pro Ser Val Pro
180 185 190
Pro Gly Cys Ser Leu Gln Trp Ser His Ser Ala Tyr Cys Gln Leu Phe
195 200 205
Val Val Val Phe Ala Val Leu Tyr Phe Leu Leu Pro Leu Leu Ile
210 215 220

26/66

Ala Phe

<210> 18
<211> 451
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 18

Met Glu Ser Ser Pro Ile Pro Gln Ser Ser Gly Asn Ser Ser Thr Leu
1 5 10 15

Gly Arg Val Pro Gln Thr Pro Gly Pro Ser Thr Ala Ser Gly Val Pro
20 25 30

Glu Val Gly Leu Arg Asp Val Ala Ser Glu Ser Val Ala Leu Phe Phe
35 40 45

Met Leu Leu Leu Asp Leu Thr Ala Val Ala Gly Asn Ala Ala Val Met
50 55 60

Ala Val Ile Ala Lys Thr Pro Ala Leu Arg Lys Phe Val Phe Val Phe
65 70 75 80

His Leu Cys Leu Val Asp Leu Leu Ala Ala Leu Thr Leu Met Pro Leu

28/66

Leu Val Val Tyr Cys Ser Met Phe Arg Val Ala Arg Val Ala Ala Met
225 230 235 240
Gln His Gly Pro Leu Pro Thr Trp Met Glu Thr Pro Arg Gln Arg Ser
245 250 255
Glu Ser Leu Ser Ser Arg Ser Thr Met Val Thr Ser Ser Gly Ala Pro
260 265 270
Gln Thr Thr Pro His Arg Thr Phe Gly Gly Gly Lys Ala Ala Val Val
275 280 285
Leu Leu Ala Val Gly Gly Gln Phe Leu Leu Cys Trp Leu Pro Tyr Phe
290 295 300
Ser Phe His Leu Tyr Val Ala Leu Ser Ala Gln Pro Ile Ser Thr Gly
305 310 315 320
Gln Val Glu Ser Val Val Thr Trp Ile Gly Tyr Phe Cys Phe Thr Ser
325 330 335
Asn Pro Phe Phe Tyr Gly Cys Leu Asn Arg Gln Ile Arg Gly Glu Leu
340 345 350
Ser Lys Gln Phe Val Cys Phe Phe Lys Pro Ala Pro Glu Glu Glu Leu
355 360 365

29/66

Arg Leu Pro Ser Arg Glu Gly Ser Ile Glu Glu Asn Phe Leu Gln Phe
370 375 380

Leu Gln Gly Thr Gly Cys Pro Ser Glu Ser Trp Val Ser Arg Pro Leu
385 390 395 400

Pro Ser Pro Lys Gln Glu Pro Pro Ala Val Asp Phe Arg Ile Pro Gly
405 410 415

Gln Ile Ala Glu Glu Thr Ser Glu Phe Leu Glu Gln Gln Leu Thr Ser
420 425 430

Asp Ile Ile Met Ser Asp Ser Tyr Leu Arg Pro Ala Ala Ser Pro Arg
435 440 445

Leu Glu Ser
450

<210> 19

<211> 321

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

31/66

Val Cys Gly Leu Leu Trp Thr Leu Cys Leu Leu Met Asn Gly Leu Thr
145 150 155 160

Ser Ser Phe Cys Ser Lys Phe Leu Lys Phe Asn Glu Asp Arg Cys Phe
165 170 175

Arg Val Asp Met Val Gln Ala Ala Leu Ile Met Gly Val Leu Thr Pro
180 185 190

Val Met Thr Leu Ser Ser Leu Thr Leu Phe Val Trp Val Arg Arg Ser
195 200 205

Ser Gln Gln Trp Arg Arg Gln Pro Thr Arg Leu Phe Val Val Val Leu
210 215 220

Ala Ser Val Leu Val Phe Leu Ile Cys Ser Leu Pro Leu Ser Ile Tyr
225 230 235 240

Trp Phe Val Leu Tyr Trp Leu Ser Leu Pro Glu Met Gln Val Leu
245 250 255

Cys Phe Ser Leu Ser Arg Leu Ser Ser Ser Val Ser Ser Ala Asn
260 265 270

Pro Val Ile Tyr Phe Leu Val Gly Ser Arg Arg Ser His Arg Leu Pro

30/66

Met Asn Gln Thr Leu Asn Ser Ser Gly Thr Val Glu Ser Ala Leu Asn
1 5 10 15

Tyr Ser Arg Gly Ser Thr Val His Thr Ala Tyr Leu Val Leu Ser Ser
20 25 30

Leu Ala Met Phe Thr Cys Leu Cys Gly Met Ala Gly Asn Ser Met Val
35 40 45

Ile Trp Leu Leu Gly Phe Arg Met His Arg Asn Pro Phe Cys Ile Tyr
50 55 60

Ile Leu Asn Leu Ala Ala Ala Asp Leu Leu Phe Leu Phe Ser Met Ala
65 70 75 80

Ser Thr Leu Ser Leu Glu Thr Gln Pro Leu Val Asn Thr Thr Asp Lys
85 90 95

Val His Glu Leu Met Lys Arg Leu Met Tyr Phe Ala Tyr Thr Val Gly
100 105 110

Leu Ser Leu Leu Thr Ala Ile Ser Thr Gln Arg Cys Leu Ser Val Leu
115 120 125

Phe Pro Ile Trp Phe Lys Cys His Arg Pro Arg His Leu Ser Ala Trp
130 135 140

32/66

275 280 285

Thr Arg Ser Leu Gly Thr Val Leu Gln Gln Ala Leu Arg Glu Glu Pro
290 295 300

Glu Leu Gln Gly Gly Glu Thr Pro Thr Val Gly Thr Asn Glu Met Gly
305 310 315 320

Ala

<210> 20

<211> 333

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Met Glu Lys Val Asp Met Asn Thr Ser Gln Glu Gln Gly Leu Cys Gln
1 5 10 15

Phe Ser Glu Lys Tyr Lys Gln Val Tyr Leu Ser Leu Ala Tyr Ser Ile
20 25 30

Ile Phe Ile Leu Gly Leu Pro Leu Asn Gly Thr Val Leu Trp His Phe
35 40 45

33/66

Trp Gly Gln Thr Lys Arg Trp Ser Cys Ala Thr Thr Tyr Leu Val Asn
50 55 60

Leu Met Val Ala Asp Leu Leu Tyr Val Leu Leu Pro Phe Leu Ile Ile
65 70 75 80

Thr Tyr Ser Leu Asp Asp Arg Trp Pro Phe Gly Glu Leu Leu Cys Lys
85 90 95

Leu Val His Phe Leu Phe Tyr Ile Asn Leu Tyr Gly Ser Ile Leu Leu
100 105 110

Leu Thr Cys Ile Ser Val His Gln Phe Leu Gly Val Cys His Pro Leu
115 120 125

Cys Ser Leu Pro Tyr Arg Thr Arg Arg His Ala Trp Leu Gly Thr Ser
130 135 140

Thr Thr Trp Ala Leu Val Val Leu Gln Leu Leu Pro Thr Leu Ala Phe
145 150 155 160

Ser His Thr Asp Tyr Ile Asn Gly Gln Met Ile Trp Tyr Asp Met Thr
165 170 175

Ser Gln Glu Asn Phe Asp Arg Leu Phe Ala Tyr Gly Ile Val Leu Thr

35/66

Ala Gly Arg Lys Arg Cys Pro Gly Leu Asn Arg Ser Gly
325 330

<210> 21
<211> 508
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 21
Met Thr Ser Thr Cys Thr Asn Ser Thr Arg Glu Ser Asn Ser Ser His
1 5 10 15

Thr Cys Met Pro Leu Ser Lys Met Pro Ile Ser Leu Ala His Gly Ile
20 25 30

Ile Arg Ser Thr Val Leu Val Ile Phe Leu Ala Ala Ser Phe Val Gly
35 40 45

Asn Ile Val Leu Ala Leu Val Leu Gln Arg Lys Pro Gln Leu Leu Gln
50 55 60

Val Thr Asn Arg Phe Ile Phe Asn Leu Leu Val Thr Asp Leu Leu Gln
65 70 75 80

Ile Ser Leu Val Ala Pro Trp Val Val Ala Thr Ser Val Pro Leu Phe

34/66

180 185 190

Leu Ser Gly Phe Leu Ser Leu Leu Gly His Phe Gly Val Leu Phe Thr
195 200 205

Asp Gly Gln Glu Pro Asp Gln Ala Arg Gly Glu Pro His Glu Asp Arg
210 215 220

Gln His Ser Pro Ser Gln Val His Pro Asp His Pro Thr Gly Val Trp
225 230 235 240

Pro Leu His Pro Leu Phe Cys Ala Leu Pro Tyr His Ser Leu Leu Leu
245 250 255

Pro His His Leu Leu Ser Ala Phe Ser Gly Leu Pro Ala Leu Asp Gly
260 265 270

Ser Gln Cys Gly Leu Gln Asp Met Glu Ala Ser Gly Glu Cys Glu Gln
275 280 285

Leu Pro Gln Pro Ser Pro Val Leu Ser Phe Lys Gly Gly Lys Asn Arg
290 295 300

Val Arg Leu Leu Gln Lys Leu Arg Gln Asn Lys Leu Gly Glu His Pro
305 310 315 320

36/66

85 90 95

Trp Pro Leu Asn Ser His Phe Cys Thr Ala Leu Val Ser Leu Thr His
100 105 110

Leu Phe Ala Phe Ala Ser Val Asn Thr Ile Val Val Val Ser Val Asp
115 120 125

Arg Tyr Leu Ser Ile Ile His Pro Leu Ser Tyr Pro Ser Lys Met Thr
130 135 140

Gln Arg Arg Gly Tyr Leu Leu Leu Tyr Gly Thr Trp Ile Val Ala Ile
145 150 155 160

Leu Gln Ser Thr Pro Pro Leu Tyr Gly Trp Gly Gln Ala Ala Phe Asp
165 170 175

Glu Arg Asn Ala Leu Cys Ser Met Ile Trp Gly Ala Ser Pro Ser Tyr
180 185 190

Thr Ile Leu Ser Val Val Ser Phe Ile Val Ile Pro Leu Ile Val Met
195 200 205

Ile Ala Cys Tyr Ser Val Val Phe Cys Ala Ala Arg Arg Gln His Ala
210 215 220

37/66

Leu Leu Tyr Asn Val Lys Arg His Ser Leu Glu Val Arg Val Lys Asp
225 230 235 240

Cys Val Glu Asn Glu Asp Glu Glu Gly Ala Glu Lys Lys Glu Glu Phe
245 250 255

Gln Asp Glu Ser Glu Phe Arg Arg Gln His Glu Gly Glu Val Lys Ala
260 265 270

Lys Glu Gly Arg Met Glu Ala Lys Asp Gly Ser Leu Lys Ala Lys Glu
275 280 285

Gly Ser Thr Gly Thr Ser Glu Ser Ser Val Glu Ala Arg Gly Ser Glu
290 295 300

Glu Val Arg Glu Ser Ser Thr Val Ala Ser Asp Gly Ser Met Glu Gly
305 310 315 320

Lys Glu Gly Ser Thr Lys Val Glu Glu Asn Ser Met Lys Ala Asp Lys
325 330 335

Gly Arg Thr Glu Val Asn Gln Cys Ser Ile Asp Leu Gly Glu Asp Asp
340 345 350

Met Glu Phe Gly Glu Asp Asp Ile Asn Phe Ser Glu Asp Asp Val Glu
355 360 365

39/66

500

505

<210> 22

<211> 1305

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 22

atggagatc tcttiagccc ctcaattctg cgcgcggcgc ccaacatttc cgtgccatc 60
ttcttgggt ggggttctca cctgaccttg gggcaggag cccctgcttc tggcgcgcc 120
agcgcgcgc tccgcctggt gtctctgggg gtcatcttgg tggggcagt ggcaggcaac 180
accacagtc tctgcctgt gtgcggcgc ggcggccct gggcggccc caagctgac 240
aagatgact tctctggt gacgtggcc ctggcgacc tgaacgctg cggcgacag 300
gctgtgac agctggcctg ggaactgctg ggcagcccc ggcggccac gggggacctg 360
gctgacct tcttgcagt gctgaggca tccggcggg ggcctctgg ccaactgtg 420
gtctatcg ccttcagag cggcgcgcg gtacgtcttc gcaacggcg gctgtgccc 480
gcctgccc tgcgcgcct ggcctggctg ctggcactgc tgcctggct gcccccggc 540
ttctgtgc gggggact cccctggcg ctgcgcgc gcgcgcgc aacttctg 600
cagcaggcg cgcgcgcgc cgcgcgcgc tggcgggg agctgctg ccaaggatc 660
ttgcgcgc tgcgcgcg gaaactgag gtatcaggt tctcaggag cgtgcgggc 720
ttctgtgc ctgttacct cctggcgct gcttggccc acctacttc cgtctgtg 780
cggcaccgc cgcaggccc cgcggctga ggccttgg ggcagcccc agtgcagcc 840
cctgcgcca ggcgcgtgc cgcgcgaag gtgcagacc tgaagatag cctgtctg 900
gctgtctg tcttggctg cagctgccc tacttggcg cccgttggc ggcgcgtg 960
tgttccggc cgcgggaga ctggaggga gaggcctgt ggcgcgtg gctgtgtg 1020

38/66

Ala Val Asn Ile Pro Glu Ser Leu Pro Pro Ser Arg Arg Asn Ser Asn
370 375 380

Ser Asn Pro Pro Leu Pro Arg Cys Tyr Gln Cys Lys Ala Ala Lys Val
385 390 395 400

Ile Phe Ile Ile Ile Phe Ser Tyr Val Leu Ser Leu Gly Pro Tyr Cys
405 410 415

Phe Leu Ala Val Leu Ala Val Trp Val Asp Val Glu Thr Gln Val Pro
420 425 430

Gln Trp Val Ile Thr Ile Ile Ile Trp Leu Phe Phe Leu Gln Cys Cys
435 440 445

Ile His Pro Tyr Val Tyr Gly Tyr Met His Lys Thr Ile Lys Lys Glu
450 455 460

Ile Gln Asp Met Leu Lys Lys Phe Phe Cys Lys Glu Lys Pro Pro Lys
465 470 475 480

Glu Asp Ser His Pro Asp Leu Pro Gly Thr Glu Gly Gly Thr Glu Gly
485 490 495

Lys Ile Val Pro Ser Tyr Asp Ser Ala Thr Phe Pro

40/66

ggatggcca acagctctt caatcccttc gtatcctct tcttcaggc gggcgactgc 1080
cggctccgc gacagctgc gaagcgctg gctctctgt gctgcgcgc gaggagagc 1140
ggcaggagc agggagggc cggggccac caggctctt accgcacag ctggccccc 1200
ctcattatc acctgctcg ggggaaccg ctggcagag ggcgttgcg cccacccct 1260
cgcgcgcca gaccttgc ttgctctgc gaagtgcct tctag 1305

<210> 23

<211> 1356

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 23

atggatcct caccatccc ccagtatca ggaactctt caatttgg gaggctcct 60
caaaccccg gtcccttat tgcagtggt gtccggagg tggcgctag gtagtctgt 120
tgggaatcg tggctctt ctctatctc ctgctgact tgaactgtt gctggcaat 180
ggcgtgta tggcgtgt ggcagagc ctgcctccc gaaatttgt ctctcttc 240
cactctgccc tggggact gctgctgccc ctgacctca tgcctcagg catctctc 300
agcttgcct tcttgacca cgcctcttt ggggagtg cctgcgcct ctactgttt 360
ctgagctgt gcttctag cctggcacc ctctgggt cagcaccatc ttggagcgc 420
tactatag tagtccac catcgctac gaggctgca tgaactgg gctgtgccc 480
tctgtctg tgggtgtg ggtgaagcc ttggcagtg ctcttgccc agtctggga 540
aggtctct gggagagg agctccagt gtcccacag gcttctact ccagtggac 600
cacagtct actgcagct ttgttggt gtcttctg tctttactt tctgtgccc 660
ctgctctca tacttggt ctactcag agtctcag tggcccgct ggtgcctag 720
cagcagggc cgtgcgcc tggatggag aaccccgc aactctga atctctcag 780

41/66

agcgcctcca cgaigctac cagctcggg gcccccaga ccaccacaa cggagcttt 840
 gggggggga agcagcagt ggttctctg gctcggggg gacagtctc gctcgttgg 900
 ttgcccact tctcttcca cctctatgt gccctcgtg ctacgccat ttaacgtgg 960
 cagtgaggga gtgtgttcc ctgcatlge tacttttgt tcaatttcaa cctttcttc 1020
 tatggatgc tcaaccgca gatccgggg gactcagca agcagtgtg ctgtcttcc 1080
 aagccagctc cagaggaga gctaggctg cctagccgg aggcctccat tgaggagaa 1140
 ttctgcagt tcttcaggg gactggctg cctctcagt cctgggttc cggacccta 1200
 cccagcccca agcaggacc acctgtgtt gactttgaa tccaggcca gatagctag 1260
 gacactctg agtcttga gcagaaact accagcaca tcatctgtc agacagctac 1320
 cctcgtctg cgccttacc cggctggag tcatga 1356

<210> 24

<211> 966

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 24

atgaacaga ctigaatag cagtgagac gtggatcag cctaaacta ttccagagg 60
 agcagatgc acaggcca cctggctg agctccctg ccatgttcc ctgcctgtc 120
 gggatggcag gcaacagat ggtgatctg ctgtgggtt ttgaatgca caggaaacc 180
 ttctgactc atacttcaa cctggcgca gccagctcc tcttctctt cagcatggt 240
 tccagctca gcttgaan ccagccctg gtcaatcca ctgacaagt ccagcagct 300
 atgaagac tgaatgact tgcctacaa gtggcctga gctgtgac ggcctcagc 360
 acccagcgt gctctctg cctcttctc atctgttca agtgcacg gccacgacc 420
 ctgtcagct ggtgtgtg cctgtgtg acactgtc tctgatgaa cgggttgacc 480

43/66

tttagctgc ttittgcta cggcatagt ctgacatgt ctgctttct ttccctctt 600
 ggtcatitt gtgtctatt cactgatgt caggacctg atcaagccg aggaacact 660
 catgaggaca ggaacacag cccagccag gtccatccg accatctac tgggtgtg 720
 cctcttacc ctctgtttg tgccttcca taccatctg tcttcttacc taccatctg 780
 ctcttctgt tctcaggact gccagctctt gatggcacc agtggctct acaagatag 840
 gaggctctg gtgagtga gcagctcct caaccagtc ctgtacttc ttcaagggg 900
 ggcanaata gactcaggt cctccagaa ctgaggcaga acaattggg tgagatcca 960
 gctgggaga agagatgcc aggttgaac agatcgggt aa 1002

<210> 26

<211> 1527

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 26

atagctcca cctgaccaa cagcagcgc gagataaca gcagccacg gtgcagccc 60
 ctctccaaa tgcctatcg cctggccac ggcataccc gctcaacct gctggtatc 120
 ttctcgcgc ccttttctg cggcaacta gtgtggcgc tagtttga gcgaagcgc 180
 cagctgtgc agtgaccaa cgttttate tttaacctc tcttcacga cctgtgcag 240
 atttctctg tggccctctg ggtgtggcc accctgtgc ctcttctc gcccttcaa 300
 agccactct gcaggccct ggttagctc acccaactgt tgccttgc cagcttcaa 360
 accatgtct tgggtcagt ggaatctac ttttccata tccacctct cctctcccg 420
 tccaatga cccagcgcg cgttatctg ctctctatg gcaactgat tggccatc 480
 ctgagagca cctctcact ctacgtctg ggcagctg cctttgatg ggcgaatgt 540
 ctctgtcca tgatcggg ggcagcccc agctacata ttctcagct ggttctctc 600

42/66

tcttctctt gcagcaagt ctgaattc aaagaatc ggtcttcag gttgacatg 540
 gtccagccg cctcaatc ggggtctta acccagta tgaactgtc cagctgacc 600
 ctcttctct ggttccggg gacttccag cagtgccgc ggcagccac accgtgttc 660
 gttgtgtcc tggctctgt cctgtgttc ctcatctgt cctgctctt gacatctac 720
 tgggtgtgc tctactgtt gacctgcgc cccagatgc aggtctgtg cttagcttg 780
 tcaagctct cctgtcctt aagcagcgc gccaccccg tcatctact cctgtgggc 840
 agccggaga gccacaggt gccacagc tcttgggga ctgtctcca acaggcctt 900
 cgcagagac cagactgga agtggggg agcccccag tggccacca tgagatggg 960
 gctga 966

<210> 25

<211> 1002

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 25

atggagaagg tggacatga taccatcag gaacaagtc tctgccagt ctacagag 60
 tacaagaag tctactctc cctggctac agtatctct ttactcagg gtgccaata 120
 aatggcactg tctgtggca ctctggggc caaacnagc gctggagctg tgcacacc 180
 tatctgtga acctgatgt ggcagactg ctctatgtc tattgcctt cctcatcct 240
 actactac tagatcag gttgccttc gggagctgc tctgaagct ggtgacttc 300
 ctgtctata tcaacttta cggcagatc ctgcctgca cctgcatc tgtcaccag 360
 ttctagggt tgtccacc accgtgttc ctgcctacc ggaaccgcg gcatgctgg 420
 ctggccaca gcaacactg ggcctgtg gctctcagc tctgcccac actggcttc 480
 tccacagcg actacatca tggcagatg atctgtatg acatgaccg ccaagagat 540

44/66

atgtctatc cactgatgt catgatgcc tctactcgc tgggttctg tgcagcccg 660
 aggcagcag ctctgtcta caatgcaag agcaacagt tggatgtcg agtcaagg 720
 tgtgtgga atagatga agaggagca gagaagagg aggttcca ggtatgagt 780
 gattttgc gccagatga agtggagtc aagccaaag aggcagat ggaagcaag 840
 gacggcagcc tgaagccaa ggaagagc accgggacca gtgagatg ttagagccc 900
 agggcagcg aggtgtcag agagagcag accgtgtcca ggcagggcag catggagg 960
 aaggagga gccacaaat tgaagagac agcatgaag cagacaagg tgcacagag 1020
 gtcaacagt gcagatga ctgggtgaa gatgacatg agtttgtga agacacatc 1080
 aatttcagt agtatagt ctgagcagc aacatcccg agagctccc acccagctg 1140
 cgtaacaga acagacccc tctctgccc aggtgtacc agtgcgaag tctaaagt 1200
 atcttctca tcttttct ctatgtcta tccctgggc cctactgct tttagcagc 1260
 ctggcgtgt ggttgatgt cgaacccag gtacccagt ggtgtacc cataatcct 1320
 tggctttct tctcagtg ctgacccc cctatgtct atgtctat gcacagacc 1380
 ataaagag aattcagga catgtgaag agtttctct gcaagaaaa gcccccga 1440
 gaagatgcc acccagact gcccgaaa gagggtgga ctgaagcaa gatttctct 1500
 tctacgatt ctgtacttt tcttga 1527

<210> 27

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

4 5 / 6 6

<400> 27

atggaggatc tctttagccc ctcaattc

28

<210> 28

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 28

ctagaaggca ctttcgcagg agcaaggc

28

<210> 29

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

4 7 / 6 6

<400> 31

atgaaccaga ctttgaatag cagtgg

26

<210> 32

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 32

tcaagccccc atctcatgg tgcaccag

28

<210> 33

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

4 6 / 6 6

<400> 29

atggagctct caccatccc ccagtcac

29

<210> 30

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 30

tcatgactcc agccggggtg agcgcgcag

29

<210> 31

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

4 8 / 6 6

<400> 33

atggagaagg tggacatgaa tacatcac

28

<210> 34

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 34

ttaccacgat ctgttcaccc ctgggcac

29

<210> 35

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

49/66

<400> 35

atgacgtcca cctgcaccaa cagcagc

28

<210> 36

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 36

tcaaggaaan gtagcagaat cgttaggaag

29

<210> 37

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

51/66

<220>

<221> misc_binding

<222> (1)

<223> Label FAM (6-carboxy-fluorescein)

<220>

<221> misc_binding

<222> (28)

<223> Label TAMRA

(6-carboxy-N,N,N',N'-tetramethylrhodamine)

<400> 39

tcagaaacctg ccagcattga atagtgc

28

<210> 40

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 40

50/66

<400> 37

ccaggagcgt tctatgcct

20

<210> 38

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 38

tgtgatcttt gctccctgca

20

<210> 39

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized TaqMan probe sequence

52/66

atcgtcttg ccccgatgt

20

<210> 41

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 41

accgcttgc ttaggtcag

20

<210> 42

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized TaqMan probe sequence

<220>

53/66

<221> misc_binding
<222> (1)
<223> Label FAM (6-carboxy-fluorescein)

<220>
<221> misc_binding
<222> (22)
<223> Label TAMRA
(6-carboxy-N,N,N',N'-tetramethylrhodamine)

<400> 42
tcgtgccctt cgtcacgctg aa

22

<210> 43
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 43
cccagcatcc ataccagaaa a

21

55/66

<223> Label FAM (6-carboxy-fluorescein)

<220>
<221> misc_binding
<222> (28)
<223> Label TAMRA
(6-carboxy-N,N,N',N'-tetramethylrhodamine)

<400> 45
tgagaaggca gagatccca tccttct

28

<210> 46
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 46
tcgcatgag caacagcat

19

<210> 47

54/66

<210> 44
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 44
ctgtgcctt ctcatgcaa a_

21

<210> 45
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized TaqMan probe sequence

<220>
<221> misc_binding
<222> (1)

56/66

<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 47
cactggactt accgccattg t

21

<210> 48
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized TaqMan probe sequence

<220>
<221> misc_binding
<222> (1)
<223> Label FAM (6-carboxy-fluorescein)

57/66

<220>

<221> misc_binding

<222> (29)

<223> Label TAMRA

(6-carboxy-N,N,N',N'-tetramethylrhodamine)

<400> 48

agatcatgtt gctccactgg aagcttct

29

<210> 49

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 49

ggatctcttt agccctcaa ttc

23

<210> 50

<211> 21

<212> DNA

59/66

<222> (25)

<223> Label TAMRA

(6-carboxy-N,N,N',N'-tetramethylrhodamine)

<400> 51

aacatttcg tgcctatctt gctgg

25

<210> 52

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 52

gctgttgact ttcaatccc a

21

<210> 53

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

58/66

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 50

aaggtcaggt tgagacccta g

21

<210> 51

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized TaqMan probe sequence

<220>

<221> misc_binding

<222> (1)

<223> Label FAM (6-carboxy-fluorescein)

<220>

<221> misc_binding

60/66

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 53

acggaggtag ctgtctgaca tga

23

<210> 54

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized TaqMan probe sequence

<220>

<221> misc_binding

<222> (1)

<223> Label FAM (6-carboxy-fluorescein)

<220>

<221> misc_binding

<222> (26)

<223> Label TAMRA

6 1 / 6 6

(6-carboxy-N,N,N',N'-tetramethylrhodamine)

<400> 54

tgagttcctg gacagcaac tcacca

26

<210> 55

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 55

ggcttctgaa tgcacaggaa

20

<210> 56

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially

6 3 / 6 6

<400> 57

ttctgcattc atatactcaa cctggcgg

28

<210> 58

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 58

tggcctcttc accctctgtt t

21

<210> 59

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

6 2 / 6 6

synthesized primer sequence

<400> 56

ggagccatg ctgaagagga

20

<210> 57

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized TaqMan probe sequence

<220>

<221> misc_binding

<222> (1)

<223> Label FAM (6-carboxy-fluorescein)

<220>

<221> misc_binding

<222> (28)

<223> Label TAMRA

(6-carboxy-N,N,N',N'-tetramethylrhodamine)

6 4 / 6 6

<400> 59

atcaagagct ggcagtcctg a

21

<210> 60

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized TaqMan probe sequence

<220>

<221> misc_binding

<222> (1)

<223> Label FAM (6-carboxy-fluorescein)

<220>

<221> misc_binding

<222> (30)

<223> Label TAMRA

(6-carboxy-N,N,N',N'-tetramethylrhodamine)

<400> 60

tcacatcac tcgtctcttc tacctacca

30

<210> 61

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 61

ccaaaatgcc catcagctt

19

<210> 62

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 62

gcactatgtt gccacgaaaa

20

<210> 63

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized TagMan probe sequence

<220>

<221> misc_binding

<222> (1)

<223> Label FAM (6-carboxy-fluorescein)

<220>

<221> misc_binding

<222> (26)

<223> Label TAMRA

(6-carboxy-N,N,N',N'-tetramethylrhodamine)

<400> 63

catcagctca accgtgctgg ttatct

26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP00/09408

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
Int. Cl. ⁷ C12N15/09, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C07K14/705, C07K16/28, C12P21/02, C12Q1/02, C12Q1/68, A61K31/711, A61K48/00, A61P43/00, G01N33/15, G01N33/50		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
Int. Cl. ⁷ C12N15/00-15/09, C07K14/705		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
GeneBank/EMBL/CDNA/GeneSeq SwissProt/PIR/GeneSeq		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 8-245697, A (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 24 September, 1996 (24.09.96) (Family: none)	1-15, 17
A	WO, 98/46620, A1 (MILLENNIUM PHARM INC), 22 January, 1998 (22.01.98) & AU, 9869736, A & US, 5891720, A & EP, 3007536, A1	1-15, 17
A	WO, 99/37679, A1 (MILLENNIUM PHARM INC), 29 July, 1999 (29.07.99) & US, 5945307, A & AU, 9922369, A & EP, 1056777, A1	1-15, 17
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family member.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "X" further document has been published on or after the international filing date "Y" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "Z" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principles or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or creative in view of the document in which alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "A" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art		
Date of the actual completion of the international search 27 March, 2001 (27.03.01)		Date of mailing of the international search report 10 April, 2001 (10.04.01)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP00/09408

Box I. Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)	
This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reason:	
1. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: 16	because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: The invention as set forth in claim 16 pertains to methods for diagnosis of diseases and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.
2. <input type="checkbox"/> Claims Nos.:	because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. <input type="checkbox"/> Claims Nos.:	because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
Box II. Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)	
This international Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows: The inventions as set forth in claims 1 to 15 and 17 are divided into groups of 3 individual inventions, i.e., inventions relating to DNAs encoding the amino acids of SEQ ID NOS:1 to 4 and 17 to 21, and DNAs having the sequence of SEQ ID NOS:5 to 8 and 22 to 26. These groups of inventions are not considered as relating to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.	
1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.	
2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.	
3. <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:	
4. <input checked="" type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:	Claims 1 to 15 and 17 (inventions relating to the DNA encoding the amino acid sequence of SEQ ID NO:1 and the DNA having the sequence of SEQ ID NO:5)
Remark on Protest <input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.	

国際調査報告		国際出願番号
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		PCT/JPO0/09408
Int. Cl. C12N15/09, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C07K14/705, C07K16/28, C12P21/02, C12Q1/02, C12Q1/68, A61K31/711, A61K48/00, A61P43/00, G01N33/15, G01N33/50		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小単位 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl. C12N15/00-15/09, C07K14/705		
最小単位以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に利用した用語)		
GeneBank/EMBL/DBJ/GeneSeq SwissProt/PIR/GeneSeq		
C. 関連すると思われる文献		
引用文献の カテゴリー	引用文献名、及び一語の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	請求の範囲の番号
A	J.P. 8-245697, A (武田薬品工業株式会社) 24. 9月. 1996 (24. 09. 96) (ファミリーなし)	1-15, 17
A	WO. 98/46620, A1 (MILLENNIUM PHARM INC) 22. 1月. 1998 (22. 01. 98) &AU, 9869736, A&US, 5891720, A&EP, 1007536, A1	1-15, 17
A	WO. 99/37679, A1 (MILLENNIUM PHARM INC) 29. 7月. 1999 (29. 07. 99) &US, 5945307, A&AU, 9922369, A&EP, 1056777, A1	1-15, 17
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般技術水準を示すもの 「B」 国際出願日時の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に拠る文献又は他の文献の発行日若しくは他の特許理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口説による開示、使用、展示等に資する文献 「P」 国際出願日時点で、かつ優先権の主要な基礎となる出願		
国際調査を完了した日		国際調査報告の発送日
27. 03. 01		1 00401
国際調査機関の名称及び先 日本特許庁 (ISA/J.P.) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (補綴のある職員) 鈴木 恵理子 4N 8114 電話番号 03-3581-1101 内線 3448

様式PCT/ISA/210 (第2ページ) (1998年7月)

国際調査報告		国際出願番号
第1欄 請求の範囲の一致の調査ができないときの見解 (第1ページの2の段)		PCT/JPO0/09408
出願第3条第3項 (PCT第17条(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成できなかった。		
1. <input checked="" type="checkbox"/> 請求の範囲 15	は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、請求の範囲 15 の発明は、疾病の診断方法に該当し、特許協力条約第17条 (2) (a) (i) 及び特許協力条約に基づく規則39.1 (iv) の規定により、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。	
2. <input type="checkbox"/> 請求の範囲	は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、	
3. <input type="checkbox"/> 請求の範囲	は、従属請求の範囲であってPCT規則44(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。	
第2欄 発明の単一性が欠如しているときの見解 (第1ページの3の段)		
次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。		
請求の範囲 1-15, 17 に記載された発明は、配列番号 1-4, 17-21 のアミノ酸配列をコードするDNA、または配列番号 5-8, 22-26 の配列を有するDNAに係る発明群という、個々の9の発明に区分され、当該発明群が単一の一般発明概念を形成するように述べている一組の発明であるとは、認められない。		
1. <input type="checkbox"/> 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。		
2. <input type="checkbox"/> 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。		
3. <input type="checkbox"/> 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった請求の範囲のみについて作成した。		
4. <input checked="" type="checkbox"/> 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。		
請求の範囲 1-15, 17 (配列番号 1 のアミノ酸配列をコードするDNA、及び配列番号 5 の配列を有するDNAに係る部分の発明)		
追加調査手数料の員数の申立てに関する注意 <input type="checkbox"/> 追加調査手数料の納付と共に出願人から員数申立てがあった。 <input type="checkbox"/> 追加調査手数料の納付と共に出願人から員数申立てがなかった。		

様式PCT/ISA/210 (第1ページの続き (1)) (1998年7月)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☒ FADED TEXT OR DRAWING

☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.